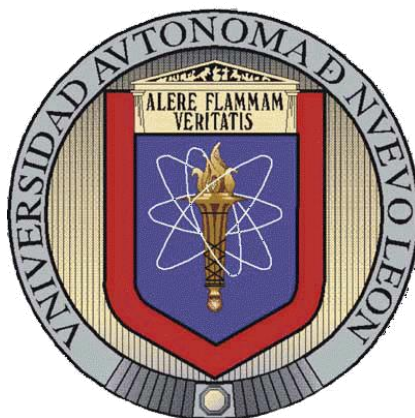


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**MECANISMOS DE ACCIÓN DE BACITRACINA Y EL ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS-
2-NITROBENZOICO EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I**

Por

SAMANTHA MARIBEL FLORES TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA en CIENCIAS con Acentuación en Microbiología**

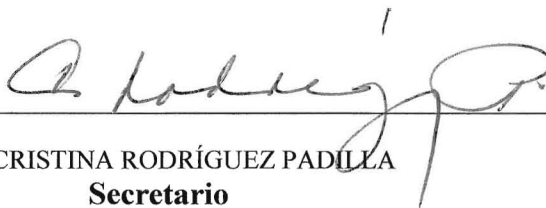
Junio, 2010

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE BACITRACINA Y EL ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS-
2-NITROBENZOICO EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I**

COMITÉ DE TESIS



DR. HUMBERTO H. LARA VILLEGAS
Director



DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Secretario



DRA. LILIANA DEL C. IXTEPAN TURRENT
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Humberto Lara Villegas, Director de mi tesis, así como a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y la Dra. Liliana Ixtepan Turrent por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Alfredo y Ma. Luisa, por su apoyo incondicional no solo durante este proyecto, sino toda la vida. Han estado conmigo a cada paso de mi vida, sin importar la distancia. Sin ellos no habría podido llegar hasta donde he llegado ni hasta donde pienso llegar.

A mis hermanos, Marilú y Alfredo, mi cuñado, Óscar, y mi sobrina Natalia. No sé qué haría sin ellos.

A todos mis amigos, por influir positivamente en mi vida y permitirme apreciarlos como son.

A Humberto, quien me ha apoyado sin importa qué, y me ha impulsado a superarme. Por permitirme aprender de él, por aconsejarme y por estar conmigo a cada paso de este trayecto. Por darme un ejemplo a seguir. Por todas las aventuras que aún nos esperan.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Pág.
1. RESUMEN y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 General	4
3.2 Específicos	4
4. HIPÓTESIS	5
5. ANTECEDENTES	6
5.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida)	6
5.1.1 Aspectos inmunológicos en la infección por VIH	6
5.1.2 Epidemiología	7
5.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	7
5.2.1 Clasificación	7
5.2.2 Ciclo de Replicación	8
5.3 Antirretrovirales (ARV)	8
5.3.1 Inhibidores de Fusión (IF)	8
5.3.2 Inhibidores de Transcriptasa Reversa Análogos a Nucleósidos (ITRAN)	9
5.3.3 Inhibidores de Transcriptasa Reversa No Nucleósidos (ITRNN)	10
5.3.4 Inhibidores de Integrasa (II)	10
5.3.5 Inhibidores de Proteasa (IP)	10
5.3.6 Resistencia a ARV	10
5.4 Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI)	11
5.4.1 Mecanismo de entrada del VIH	12
5.4.1.1 Unión de gp120 al Receptor CD4	12
5.4.1.2 Unión al Correceptor	13
5.4.1.3 Fusión de Membrana mediada por gp41	13
5.4.2 Nuevos blancos debido a la participación de PD en la entrada viral	13
5.4.2.1 Actividad enzimática de PDI	13
5.4.2.2 Interacción PDI-CD4	14
5.4.2.3 Enlaces disulfuro de gp120 que son sustratos para PDI	14
5.4.3 Inhibidores de PDI	15
5.4.3.1 Bacitracina	15
5.4.3.2 DTNB	15
6. MATERIALES Y MÉTODO	16
6.1 Reactivos	16
6.2 Cepas virales	16
6.2.1 VIH-1 IIIB	16
6.2.2 VIH-1Ba-L	16
6.3 Cultivo celular	16
6.3.1 HeLa/CD4-LTR- β -gal	16
6.3.2 HL2/3	16
6.4 Ensayos de Citotoxicidad	16

6.5 Ensayos de Inhibición	17
6.6 Ensayos de Fusión basado en Células Fusogénicas	17
6.7 Ensayos de Actividad Residual	17
6.8 Ensayos por Adición por Tiempos	18
6.9 Ensayos de Protección Celular en Tiempos	18
6.10 Análisis Estadístico	18
7. RESULTADOS	19
7.1 Citotoxicidad de Bacitracina y DTNB	19
7.2 Inhibición del VIH-1 por Bacitracina y DTNB	19
7.3 Actividad Residual de Bacitracina y DTNB	19
7.4 Efecto de Bacitracina y DTNB sobre cepas M-trópicas	20
7.5 Ensayos de fusión basados en células fusogénicas	22
7.5.1 Efecto inhibitorio sobre las células CD4	22
7.5.2 Efecto inhibitorio sobre las células Env	24
7.6 Sitio de Intervención de Bacitracina y DTNB	26
7.7 Protección Celular de Bacitracina y DTNB	28
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIONES	35
10. LITERATURA CITADA	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Ciclo de Replicación del VIH-1	9
2. Interacción de PDI con CD4 y gp120	13
3. Modo de acción de PDI en la entrada del VIH-1	14
4. Efecto de Bacitracina sobre Células CD4 en la Inhibición de la Infección	20
5. Efecto de DTNB sobre Células CD4 en la Inhibición de la Infección	20
6. Efecto de T-20 sobre Células CD4 en la Inhibición de la Infección	21
7. Efecto de UC781 sobre Células CD4 en la Inhibición de la Infección	21
8. Efecto de Bacitracina sobre Células Env en la Inhibición de la Infección	22
9. Efecto de DTNB sobre Células Env en la Inhibición de la Infección	23
10. Efecto de T-20 sobre Células Env en la Inhibición de la Infección	23
11. Efecto de UC781 sobre Células Env en la Inhibición de la Infección	24
12. Actividad residual de Bacitracina sobre IIIB	25
13. Actividad residual de Bacitracina sobre IIIB	25
14. Efecto de Bacitracina sobre Ba-L	26
15. Efecto de DTNB sobre Ba-L	26
16. Tiempo de Intervención de Antirretrovirales	27
17. Tiempo de Intervención de Bacitracina	28
18. Tiempo de Intervención de DTNB	28
19. Protección Celular de Bacitracina	29
20. Protección Celular de DTNB	29

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
I. Valores de IC ₅₀ y CC ₅₀ de Bacitracina y DTNB.	19

ABREVIATURAS USADAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ARV: Antirretroviral (es)
ATP: Adenosín Trifosfato
B-gal: β -galactosidasa
CA: Cápside
CC₅₀: Concentración Citotóxica al 50%
CENSIDA: Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
IF: Inhibidores de Fusión
IC₅₀: Concentración Inhibitoria al 50%
II: Inhibidores de Integrasa
IN: Integrasa
IP: Inhibidores de la Proteasa
IT: Índice Terapéutico
ITRAN: Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de Nucleósidos
ITRNN: Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Nucleósidos
LTR: *Long Terminal Repeat*
M-trópico: Cepa de VIH con tropismo a macrófagos
MA: Matriz
NC: Nucleocápside
nm: Nanómetros
nM: Nanomolar
ORF: Marco Abierto de Lectura
PDI: Proteína Disulfuro Isomerasa
PR: Proteasa
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SU: Superficie
T-trópico: VIH con tropismo a linfocitos T
T-20: Enfuvirtide
TAR: Elemento de Respuesta a la Transactivación
TARAA: Terapia Antirretroviral Altamente Activa
T CD4: Células T cooperadoras CD4+
Th: Células T cooperadoras
TR: Transcriptasa Reversa
TM: Transmembranal
UNAIDS: *United Nations Joint Programme on HIV/AIDS*
URL: Unidades Relativas de Luz
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
VIH-1: Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo I
VIH-2: Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo II

ÁREA DE TRABAJO

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BL-3) del Laboratorio de Inmunología y Virología (L.I.V.) del Departamento de Microbiología e Inmunología (D.E.M.I.) de la Facultad de Ciencias Biológicas (F.C.B.) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) en el periodo de Enero del 2009 a Diciembre del 2009.

1. RESUMEN

Actualmente, todos los antirretrovirales usados contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo I (VIH-1), se conocen por crear resistencias asociadas a mutaciones en las cepas de VIH-1. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos. Los Inhibidores de Fusión o Entrada representan una nueva generación de antirretrovirales para el tratamiento de la infección de VIH-1. Entre ellos, dos agentes conocidos por inhibir la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI), una proteína celular requerida para el inicio de la infección con VIH-1, son el antibiótico Bacitracina y el reactivo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), y actualmente se encuentran en investigación. En este trabajo se estudió la posibilidad de que Bacitracina y DTNB puedan tener actividad virucida. Por medio de ensayos de actividad residual, se encontró que ambos compuestos mostraron actividad virucida de forma dosis-respuesta. Además, tanto Bacitracina como DTNB parecen depender en el tropismo viral para inhibir eficientemente la infección de VIH-1 cuando son expuestos sólo al virus. Aún más, se realizaron ensayos de fusión basados en células fusogénicas para estos dos compuestos, y como se esperaba, tanto Bacitracina como DTNB mostraron inhibición en forma de dosis-respuesta cuando se les expuso a ambos tipos de células. Es posible que al menos DTNB actúe en gp120, NC y/o Tat virales. Por último, para determinar el blanco antiviral de Bacitracina y DTNB, se realizó un ensayo de adición por tiempos, para delimitar la(s) etapa(s) del ciclo replicativo viral que es bloqueada por estos compuestos, y los resultados indican que no sólo actúan en etapas tempranas, sino también en etapas tardías. Esta es la primera vez, que se conoce, que tanto Bacitracina como DTNB han mostrado ser agentes virucidas efectivos contra la infección de VIH-1.

ABSTRACT

Currently, all known antiretrovirals drugs used against human immunodeficiency virus type I (HIV-1), are known to produce resistance associated mutations in HIV-1 strains. Thus, the search for new drugs to treat HIV infection is necessary. Entry inhibitors represent a new generation of antivirals for the treatment of HIV infection. Among these, agents known to inhibit protein disulfide isomerase (PDI), a cell-surface protein critical in HIV-1 entry, such as the antibiotic Bacitracin and the membrane-impermeant thiol reagent 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) are currently being researched. Here we studied the possibility that both Bacitracin and DTNB might have virucidal activity. By means of residual activity assays, we found that both compounds showed antiviral activity in a dose-dependent manner. Also, both Bacitracin and DTNB seem to depend on the tropism exhibited by HIV-1 strains to efficiently inhibit HIV-1 infection when exposed only to the virus itself. Furthermore, cell-based fusion assays were performed for these two compounds and as expected, both Bacitracin and DTNB showed inhibition in a dose-dependent manner when exposed to both type cells, which could easily suggest that both Bacitracin and DTNB seem to act highly on gp120 and/or gp41, and also on Tat, Rev, Nef and/or Gag-products. In addition, to further determine the antiviral target of Bacitracin and DTNB, a time-of-addition experiment was used to delimit the stage(s) of the viral life cycle that is blocked by these compounds, and our findings suggest that they act not only at early viral cycle stages but also at late stages. This is the first time, to our knowledge, that both Bacitracin and DTNB have been shown to be effective virucidal agents against HIV-1 infection.

2. INTRODUCCIÓN

La constante presencia de resistencias del VIH-1 a los fármacos antirretrovirales aprobados en aquellos pacientes infectados ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos agentes que puedan ser inhibidores en alguna fase de la infección del virus. Existen muchos agentes potencialmente inhibidores que actualmente se encuentran en investigación en diferentes fases clínicas de estudio. Se clasifican dependiendo de la fase del ciclo replicativo del virus en la cual participen. Los fármacos actuales pueden actuar sobre las enzimas virales o en la fase previa a la replicación del virus, cuando está por entrar a la célula. Estos se conocen de forma general, como Inhibidores de Fusión (IF).

La mayoría de los inhibidores actúan en proteínas virales, ya sea en la fase de fusión, o en la parte replicativa, que se lleva a cabo dentro de la célula huésped, donde los inhibidores actúan en las enzimas virales. Sin embargo, existen algunos inhibidores en estudio que ejercen su efecto inhibitorio en la célula huésped que de alguna manera evita la unión del virus con la célula, pero aunque esto impide eficientemente la infección por el VIH-1, desafortunadamente también puede impedir que las células realicen sus funciones normales, y puesto que las células a las cuales infecta el VIH-1, son linfocitos T CD4 y macrófagos, éstas son células pertenecientes al sistema inmune, y cualquier incapacidad en sus funciones normales afectaría de forma general al sistema inmune del individuo.

Existen dos compuestos que se conoce son inhibidores de la infección del VIH-1, Bacitracina y DTNB, los cuales aún se encuentran en investigación. Se ha determinado que actúan inhibiendo la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI), una proteína celular requerida para el inicio de la infección con VIH-1, es decir, son Inhibidores de Fusión.

Sin embargo, debido a que PDI posee muchas funciones fisiológicas en la célula, su bloqueo por estos compuestos la incapacitaría para realizar aquellas funciones importantes en la célula, como lo son sus efectos reductivos. Por esto, estos dos compuestos han sido considerados por no tener potencial prometedor como agentes terapéuticos.

No obstante, aún no se conoce el mecanismo completo de acción de estos potenciales inhibidores en la infección del VIH-1. Por ello, se pretende analizar si estos dos agentes inhibidores, que se sabe ejercen su efecto en la célula, actúan también en el virus, de forma que serían considerados no sólo como Inhibidores de PDI, sino como inhibidores que actúen en el virus propio.

Además, se pretende determinar si estos compuestos protegen de alguna manera a la célula contra la infección del virus por un tiempo determinado. Así, estos compuestos podrían ser reconsiderados como agentes terapéuticos al determinar su efecto inhibitorio en el virus. La importancia de este trabajo recae en la necesidad de ofrecer a los pacientes nuevos fármacos que puedan ser efectivos contra la infección del VIH-1.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Profundizar el estudio de los Inhibidores de PDI, Bacitracina y DTNB, respecto a sus efectos inhibitorios tanto en la célula huésped como en el virus contra la infección del VIH-1.

3.2 Específicos

1. Determinar la Concentración Inhibitoria de Bacitracina y DTNB requerida para inhibir en un 50% la infección del VIH-1.
2. Determinar si Bacitracina y DTNB presentan citotoxicidad (determinar la Concentración Citotóxica al 50%).
3. Determinar mediante el ensayo de células fusogénicas que Bacitracina y DTNB actúan en la célula, específicamente, en fase de fusión.
4. Determinar mediante el ensayo de células fusogénicas si Bacitracina y DTNB actúan sobre el virión y/o los procesos biosintéticos virales.
5. Corroborar mediante el ensayo de actividad residual si Bacitracina y DTNB actúan efectivamente en el virus.
6. Determinar mediante el ensayo de adición por tiempos si Bacitracina y DTNB actúan sobre otra fase del ciclo replicativo del virus.
7. Determinar si Bacitracina y DTNB protegen a las células contra la infección de VIH-1, y si es así, determinar el tiempo mínimo de protección.
8. Evaluar la capacidad de inhibición de Bacitracina y DTNB sobre cepas M-trópicas de VIH-1.

4. HIPÓTESIS

Los inhibidores de la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI), Bacitracina y DTNB, también son agentes virucidas que actúan sobre la partícula viral de VIH-1 inhibiendo la infección.

5. ANTECEDENTES

5.1 Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida)

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue primero reconocido a principio de los 80s en Estados Unidos (Gottlieb *et al.*, 1981), determinado como enfermedad infecciosa en 1983, cuyo agente causal es un retrovirus (Hahn *et al.*, 2000), el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Coffin *et al.*, 1986). Finalmente, se determinó que la infección con este retrovirus (VIH) resulta en una profunda inmunosupresión debido predominantemente a una depleción selectiva de los linfocitos T colaboradores (Th) que expresan el receptor del virus, la molécula CD4 (Fauci, 1988).

Una vez que el virus ha invadido las células T CD4, el proceso es irreversible y progresa hacia el deterioro gradual y crónico del sistema inmune, presentando en algún momento de la enfermedad complicaciones infecciosas o tumorales que pueden comprometer la vida del paciente. Esta es la etapa de la infección que se conoce como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

A medida que avanza la enfermedad y el sistema inmunológico del individuo va siendo afectado, comienzan a surgir enfermedades oportunistas, tales como: tuberculosis, neumonía, algunos tipos de cáncer, candidiasis e infecciones del sistema nervioso (toxoplasmosis y meningitis, por ejemplo) (Uribe-Zúñiga, 1999).

5.1.1 Aspectos inmunológicos en la infección por VIH

El VIH es un virus linfotrópico que infecta primordialmente a las células T cooperadoras (Th). Dado que estas células juegan un papel central en la respuesta inmune adquirida o adaptativa, su destrucción y pérdida condicionan un estado muy grave de inmunodeficiencia.

Para transmitir la infección es indispensable el intercambio directo de fluidos corporales. Las relaciones sexuales son el modo más común de transmisión, pero lo es también el contacto directo con sangre, como ocurre con agujas contaminadas y transfusión de sangre. Las madres infectadas pueden transmitir la infección a sus hijos durante el embarazo, en el momento del nacimiento y durante la lactancia (Ruiz-Argüelles, 2008).

El VIH transmitido por vía sexual alcanza el torrente circulatorio a partir de las mucosas que revisten el tracto genital, el recto y la boca. Los macrófagos y células dendríticas en estas mucosas captan al virus y lo transportan a los ganglios linfáticos, que contienen grandes cantidades de células Th, identificadas por el fenotipo CD3+/CD4+ (Fauci *et al.*, 1996).

Una vez en esta localización, el VIH induce la respuesta inmune adaptativa, que se manifiesta por la síntesis y secreción de anticuerpos y la generación de células T citotóxicas específicas. Sin embargo, pueden pasar de 1 a 6 meses para que un individuo infectado por VIH desarrolle cantidades detectables de anticuerpos en el suero. Con el paso del tiempo la intensidad de la respuesta inmune contra el VIH se debilita a medida que las células T de memoria (CD3+/CD4+/CCR5+) se destruyen progresivamente (Ruiz-Argüelles, 2008).

5.1.2 Epidemiología.

A finales del 2007, UNAIDS estimó que a nivel mundial existen 33.2 millones de personas que viven con VIH, de los cuales 30.8 millones eran adultos, 15.4 millones mujeres, y 2.5 millones menores de 15 años (UNAIDS, 2007). Cada día se infectan por el VIH en todo el mundo alrededor de 11 mil personas. Aproximadamente el 40% de las nuevas infecciones por VIH, se producen en jóvenes de entre 15 y 24 años. De acuerdo a las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA en México existen 131 mil personas adultas infectadas por el VIH. En Nuevo León, a la fecha, se conocen 3,650 personas infectadas (CENSIDA, 2009).

5.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un virus complejo de ARN perteneciente al género *Lentivirus* de la familia Retroviridae. Es un virus envuelto de 100 a 120 nm de diámetro, con morfología heterogénea y una cápside en forma cónica. Posee un genoma de ARN de cadena sencilla positiva que tiene la capacidad de transcribir su genoma a ADN en la célula hospedera mediante la enzima llamada transcriptasa inversa (TR).

El VIH posee tres genes característicos: *gag* (gen antígeno grupo-específico), que codifica para las proteínas de la cápside y nucleocápside virales; *pol* (polimerasa), que codifica para las enzimas virales y *env* (envoltura) que codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral. Contiene varios marcos abiertos de lectura (ORF) traslapados que codifican para las proteínas reguladoras/accesorias Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev y Nef.

Dentro de la cápside viral se encuentran dos copias (generalmente idénticas) del genoma viral de ~9.3 kb. El genoma del VIH está flanqueado por las secuencias largas de repetición terminal (LTR), que cumplen múltiples funciones en las diferentes etapas del ciclo de replicación del VIH (Freed and Martin, 2007).

La cápside y la matriz proteica del virus están conformadas por las proteínas codificadas por *gag* (las proteínas virales por convención se nombran con un número que corresponde a su tamaño): p24 (CA), que constituye la cápside viral; p17 (MA), que forma la matriz proteica asociada a la cara interna de la envoltura viral; p7 (NC), que constituye la nucleocápside asociada al ARN viral y p6, que es importante para la liberación de los viriones nuevos al interaccionar con proteínas asociadas al tránsito de vesículas en la célula hospedera (Freed and Martin, 2007; Levy, 2007). Las enzimas codificadas por *pol* son: proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR), e integrasa (IN). Las proteínas virales Env provienen de la proteólisis por enzimas celulares de la glicoproteína precursora gp160, que origina a gp120 (SU), una glicoproteína de superficie, y gp41 (TM), una glicoproteína transmembranal (Rubbert *et al.*, 2006).

5.2.1 Clasificación

Dos tipos de VIH se reconocen actualmente. El VIH-1 fue primero aislado en 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), y el VIH-2 en 1986 (Clavel *et al.*, 1986). Ambos se replican en las células T CD4 y se consideran patógenos en las personas infectadas, aunque la inmunodeficiencia puede ser más severa con el VIH-2, el cual actualmente se encuentra confinado en su mayor parte en África (Rubbert *et al.*, 2006).

5.2.2 Ciclo de replicación

El VIH se une a las células blanco a través del receptor celular CD4 (Dalglish *et al.*, 1984; Fauci, 1988), el cual es necesario pero no suficiente para la infección; se requieren correceptores para los pasos subsecuentes (Fig. 1). Los receptores de quimiocinas CCR5 (en macrófagos) y CXCR4 (en linfocitos T) funcionan como los principales correceptores del virus (Moore *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 1999). La glicoproteína gp120 se une al CD4, lo que induce cambios conformacionales en gp120 que exponen los dominios de unión al correceptor en gp120. La unión del correceptor causa otro cambio conformacional que expone el dominio de fusión en gp41, a través del cual se unen las membranas celular y viral, permitiendo la liberación de la cápside viral en la célula (Chan and Kim, 1998).

Seguido de la liberación de la cápside viral en la célula, que incluye ARN viral, proteínas y enzimas virales, la TR convierte el ARN viral a ADN viral, el cual luego es transportado al núcleo celular (Hu and Temin, 1990; Panganiban, 1990) e integrado al genoma celular a través de la enzima IN. El provirus integrado es transcrito y el genoma del ADN proviral es flanqueado por LTR en ambos extremos. Inicialmente, el ARNm viral es cortado en múltiples transcritos que codifican para Tat y Rev virales, las cuales son proteínas reguladoras de la transcripción (Rubbert *et al.*, 2006).

En la etapa final del ciclo viral, que comprende el ensamblaje y salida del VIH, la poliproteína Env (gp160) es cortada por la PR y procesada a las dos glicoproteínas de envoltura, gp41 y gp120, las cuales son transportadas a la membrana plasmática de la célula donde gp41 ancla la gp120 a la membrana de la célula infectada (Campbell *et al.*, 2001). La proteína madura CA forma la cápside viral, la NC produce la encapsidación del genoma completo viral de ARN y la proteína p6 regula la salida de los nuevos viriones de la célula infectada. El virus adquiere una envoltura lipídica al salir de la célula infectada. Al salir de la célula infectada, el virus está listo para iniciar otra ronda de infección (Freed and Martin, 2007).

5.3 Antirretrovirales (ARV)

Los fármacos antirretrovirales (ARV) aprobados intentan bloquear la replicación viral en el interior de las células al inhibir enzimas virales, o bloquean la entrada del virus a la célula (Pomerantz and Horn, 2003). Se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, y hasta la fecha existen cinco clases de fármacos ARV:

5.3.1 Inhibidores de Fusión (IF)

Estos inhibidores, a diferencia de los demás que bloquean la replicación del VIH en la célula infectada, impiden la entrada del VIH a las células blanco (Moore and Doms, 2003). El inhibidor de la fusión Enfuvirtida, también llamado T-20, es un péptido sintético de 36 aminoácidos derivado de la porción N-terminal de la glucoproteína gp41 de la envoltura del VIH (Lalezari *et al.*, 2003). Actúa uniéndose a gp41, así inhibiendo el cambio conformacional de gp41 necesario para la fusión de las membranas viral y celular (Kilby *et al.*, 1998).

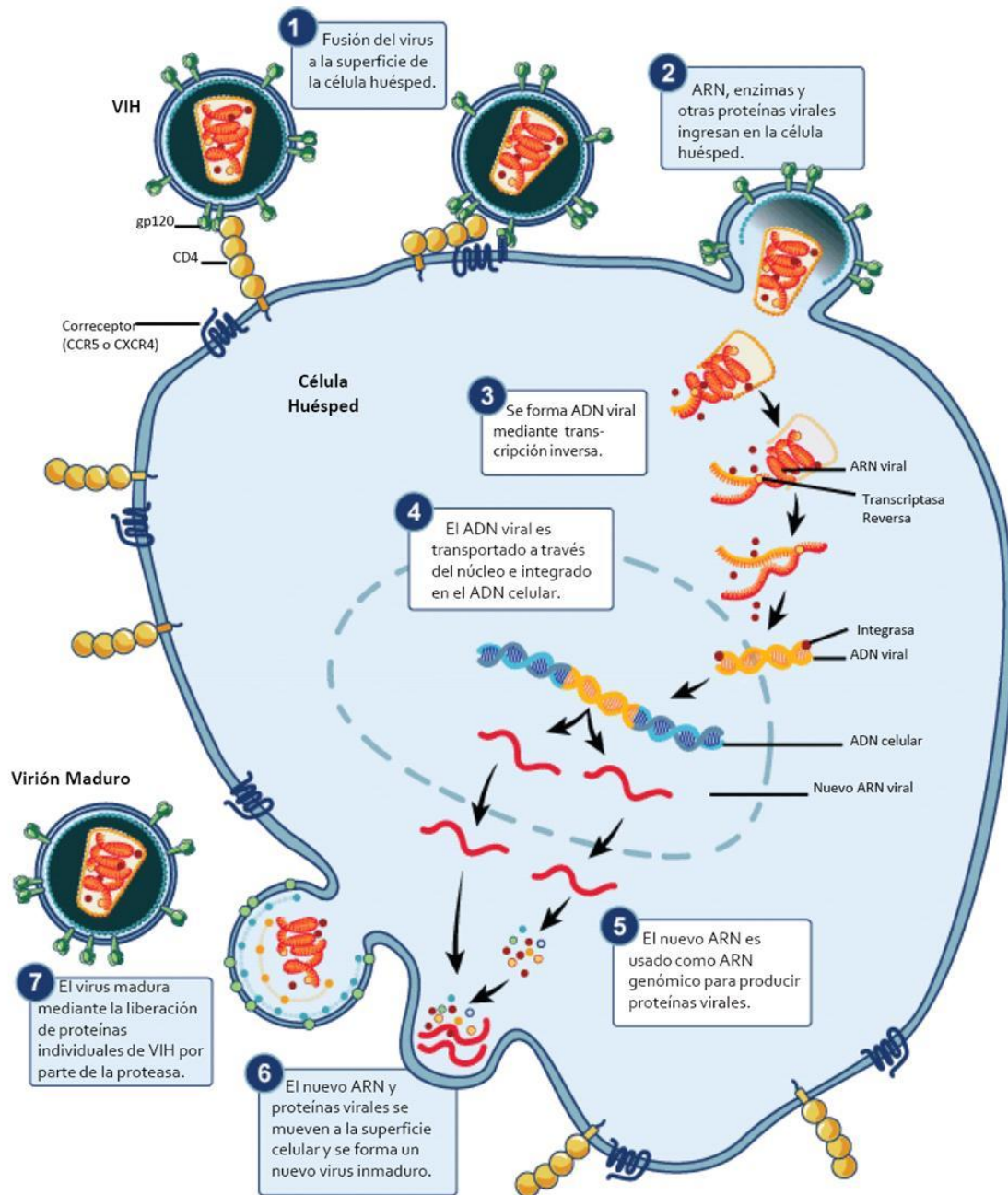


Figura 1. Ciclo de replicación del VIH-1. 1) El VIH se une a la célula por medio de un receptor. 2) El VIH libera su contenido en la célula blanco. 3) La enzima Transcriptasa Reversa copia el ARN viral en ADN. 4) El ADN viral es insertado en el ADN celular. 5) Se producen proteínas y enzimas virales. 6) Nuevas partículas virales se ensamblan y brotan de la célula. 7) El virus madura para comenzar el proceso infeccioso de nuevo (Modificado de NIAID, 2009).

5.3.2 Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos a Nucleósidos (ITRAN)

Su blanco es la enzima transcriptasa reversa del VIH. Actúan como sustratos alternativos o bloques de construcción falsos de esta enzima, compitiendo con los

nucleósidos fisiológicos. Difieren de ellos sólo en una pequeña modificación en la molécula de ribosa. La incorporación de estos análogos de nucleósidos interrumpe la síntesis de ADN, al no poderse formar los enlaces fosfodiéster que normalmente estabilizan la doble cadena. Para poder actuar, los ITRAN necesitan previamente introducirse en las células y fosforilarse hasta transformarse en derivados trifosfato (Richman, 2001).

5.3.3 Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Nucleósidos (ITRNN)

Como los ITRAN, los fármacos del grupo ITRNN ejercen su acción al inhibir a la enzima transcriptasa reversa. A diferencia de los ITRAN, no inhiben a la TR con un sustrato alternativo, sino que se unen directamente y de manera no competitiva con la enzima, en una posición cercana al sitio de unión del sustrato, o sea, de los nucleósidos. El complejo que resulta bloquea el sitio de unión, activado por catalizador de la TR, la cual entonces se puede unir con menos nucleósidos de lo normal y la polimerización se hace significativamente más lenta. En contraste con los ITRAN, los ITRNN no necesitan de activación dentro de las células (Richman, 2001).

5.3.4 Inhibidores de Integrasa (II)

Uno de los pasos más críticos en el ciclo del VIH es la integración del genoma viral en el ADN celular. Esto permite que la célula huésped se convierta en una “fábrica de VIH” y produzca muchos viriones. La enzima Integrasa es la que realiza esta tarea, y los inhibidores de Integrasa detienen esta enzima. Estos II son oligonucleótidos (pequeños segmentos de AND o ARN que son sintéticamente preparados) modificados que pueden servir para bloquear las interacciones ARN/ADN y modificar la síntesis de proteínas o enzimas. La única desventaja que poseen es que sólo tienen una oportunidad de atacar. Si fallan, cualquier intento posterior es inútil puesto que la información genética ya está incorporada (Serrao *et al.*, 2009).

5.3.5 Inhibidores de Proteasa (IP)

Esta clase de ARV bloquea el sitio activo y catalítico de la proteasa del VIH, al ocupar exactamente el sitio activo de esta enzima. Esto evita el corte proteolítico de las proteínas virales recientemente hechas, lo que conduce a la liberación de partículas virales inmaduras que son incapaces de infectar nuevas células (Eron, 2000).

5.3.6 Resistencia a ARV

La introducción de la Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARAA) ha cambiado dramáticamente el manejo de la enfermedad de VIH. Esta terapia de combinación de ARV que contienen por lo menos un IP y dos inhibidores de TR ha tenido un impacto impresionante en la letalidad del SIDA, con una importante disminución en la frecuencia de infecciones oportunistas (Åsjö, 2002). No obstante, muchos pacientes no logran alcanzar una supresión viral. Varios factores son la causa, pero la resistencia a los ARV actuales persiste como un elemento importante en el fracaso de la terapéutica contra el SIDA (Palella *et al.*, 1998; Youree y D’Aquila, 2002).

El VIH presenta una elevada variabilidad genética, la cual se debe, en primer término, a las propiedades de la TR, una ADN polimerasa que no posee propiedades de exonucleasa 3’-5’, por lo que no tiene la capacidad de corregir los errores que ocurren

durante la replicación. El alto grado de replicación a lo largo del curso de la infección y la aparición de muchas mutaciones sirven como bases para la emergencia de variantes resistentes bajo la presión selectiva de los ARV (Sharma, 2000). Por esto, es imperativo desarrollar fármacos más efectivos para sobrepasar la resistencia del virus. Nuevas moléculas podrían bloquear los blancos virales conocidos u otros nuevos (Ferrari & Söling, 1999).

5.4 Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI)

La enzima PDI es un miembro con multidominios y multifuncional, que pertenece a la superfamilia tioredoxina (Ferrari & Söling, 1999; Freedman *et al.*, 2002). Las proteínas PDI contienen al menos un dominio tioredoxina, el cual se ha demostrado que juega un papel importante en la actividad enzimática (Ferrari & Söling, 1999).

PDI es una proteína-tiol oxidorreductasa de 57-kDa (Edman *et al.*, 1985) que se conoce que cataliza todas involucradas en la formación de enlaces disulfuro nativos (Ellgaard and Rudock, 2005). Puede catalizar la oxidación, reducción e isomerización de los tioles (-SH) y/o disulfuros (S-S), ocurriendo este último mediante el rearrreglo de disulfuros intramoleculares o a través de ciclos de reducción y oxidación (Schwaller *et al.*, 2003). Es decir, PDI está involucrada en el procesamiento y maduración de las proteínas secretoras en el retículo endoplasmático (Ferrari & Söling, 1999).

PDI está presente en su mayoría en el retículo endoplasmático, donde es retenida por su secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) C-terminal (Munro and Pelham, 1987) y actúa como oxidasa para formar enlaces disulfuro en proteínas nacientes y asiste en el plegamiento proteico (Noiva and Lennarz, 1992; Bulleid, 1993; Freedman *et al.*, 1994; Gilbert, 1997). También se encuentra ligeramente adherida en la superficie de las células mamíferas, donde actúa como una reductasa para cortar los enlaces disulfuro de las proteínas adheridas a la célula (Feener *et al.*, 1990; Yoshimori *et al.*, 1990). Su función redox está basada en la presencia de dos residuos de cisteína en sus sitios activos Cys-Gly-His-Cys (CXXC) (Ferrari & Söling, 1999).

La propiedad de PDI de unirse a diferentes péptidos es esencial a su función dentro y fuera de la célula. Las funciones de la superficie de PDI incluyen la unión a péptidos, adhesión celular y tal vez, actividades como chaperona (Ferrari & Söling, 1999). Algunos ejemplos específicos de sus funciones incluyen: la interacción con el receptor de la toxina de la difteria para facilitar el transporte del fragmento tóxico en el citoplasma (Ryser *et al.*, 1991), la reducción de un enlace disulfuro en el ectodominio del receptor de tirotrópina (Couët *et al.*, 1996), el control redox de tioles/disulfuros exofaciales de proteínas de linfocitos (Lawrence *et al.*, 1996; Täger *et al.*, 1997), la unión a trombospondina extracelular (Hotchkiss *et al.*, 1998), la unión a óxido nítrico en una reacción requerida para el transporte de óxido nítrico a los megacariocitos y para la maduración de plaquetas (Zai *et al.*, 1999), y su participación en el intercambio de tioles/disulfuros que actúan en la fusión de gametos para producir cambios conformacionales en las proteínas de fusión activas (Ellerman *et al.*, 2006). PDI también es una subunidad esencial de la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H) (Pihlajaniemi *et al.*, 1987) y de la proteína de transferencia de triglicéridos en los microsomas (MTP) en células mamíferas (Wetterau *et al.*, 1990).

Recientemente, se determinó el papel crítico de PDI en la infección del VIH (Ryser *et al.*, 1994; Fenouillet *et al.*, 2001; Gallina *et al.*, 2002; Barbouche *et al.*, 2003; Markovic *et al.*, 2004).

5.4.1 Mecanismo de entrada del VIH

Se determinó que el VIH-1 y su célula blanco llevan a cabo un intercambio tio-disulfuro mediado por PDI y que la reducción de disulfuros críticos en las glicoproteínas de la envoltura viral puede ser el evento inicial que dispara los cambios conformacionales requeridos para la entrada del VIH-1 (Ryser *et al.*, 1994).

5.4.1.1 Unión de gp120 al Receptor CD4. La entrada del VIH a la célula huésped es mediada por las glicoproteínas de envoltura, las cuales están organizadas como picos que sobresalen de la superficie del virión. Estos complejos están anclados a la membrana viral por la glicoproteína transmembranal gp41. La superficie del pico está compuesto principalmente de la glicoproteína externa, gp120, asociada por interacciones no covalentes con cada subunidad del complejo trimérico de la glicoproteína gp41 (Kowalski *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1995).

Gp120 consiste de cinco secciones de secuencias relativamente conservadas (C), interrumpidas por cinco regiones altamente variables (V) (Wyatt and Sodroski, 1998). Las primeras cuatro regiones variables forman bucles de superficie expuestos que contienen enlaces disulfuro en sus bases (Leonard *et al.*, 1990). Las regiones conservadas forman estructuras discontinuas importantes para la interacción con el ectodominio gp41 y con los receptores virales en la célula blanco (König, 2002).

Por su parte, CD4 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) que se une al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para potenciar la respuestas de las células T (König, 2002). Es un receptor expresado en la superficie de linfocitos T, monocitos, células dendríticas, entre otros; media las interacciones célula-célula del sistema inmune y actúa como el receptor principal del VIH-1. Consiste de una porción extracelular, un segmento transmembranal y una cola citoplasmática (Maddon *et al.*, 1985). La porción extracelular consiste de cuatro dominios parecidos a Ig (Harris *et al.*, 1990; Ryu *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990), D1 a D4. Los dominios D1, D2 y D4 contienen un enlace disulfuro. El corte del enlace disulfuro de D2 es importante para la fusión dependiente de CD4 (Matthias *et al.*, 2002; Matthias and Hogg, 2003).

Se demostró que PDI de superficie celular está fuertemente unido a CD4, puesto que CD4 también tiene un sitio de unión para PDI (Fenouillet *et al.*, 2001; Gallina *et al.*, 2002). Cuando gp120 del virus se une al CD4 de la célula huésped, se forma un complejo: PDI-CD4-gp120. De hecho, gp120 puede potenciar la interacción de PDI-CD4 (Fenouillet *et al.*, 2001).

La interacción de PDI-CD4 no previene la unión de CD4 a gp120 en la superficie celular (Gallina *et al.*, 2002), sugiriendo que el ectodominio de CD4 tiene sitios de unión separados para las dos proteínas. Mientras gp120 se une al dominio externo de CD4 (D1), PDI se une al dominio interno D3 (Matthias *et al.*, 2002; Fig. 2). La proximidad de estos sitios se debe a que los dominios de unión a péptidos de PDI no se traslapan con su sitio activo (Guthapfel *et al.*, 1996), que permanece libre para interactuar con gp120.

Se reportó que gp120 contiene 9 enlaces disulfuro conservados, 3 de los cuales están situados cerca del dominio de unión a CD4 (Leonard *et al.*, 1990) y por lo tanto, en el complejo PDI-CD4-gp120, PDI puede alcanzar y reducir probablemente 2 de los 9 enlaces disulfuro de gp120 (Kwong *et al.*, 1998; Gallina *et al.*, 2002; Barbouche *et al.*, 2003) pero no reduce los enlaces disulfuro de CD4 (Gallina *et al.*, 2002).

5.4.1.2 Unión al Correceptor. Esta reducción produce cambios conformacionales que probablemente estabilizan la unión de gp120 a CD4 (Sattentau *et al.*, 1993; Hsu and Bonvin, 2004) y exponen la región V3 de gp120 para la subsecuente unión al correceptor (Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996), puesto que se sabe que la región V3 es el principal determinante de la especificidad al co-receptor (Speck *et al.*, 1997). Subsecuentemente se forma un complejo proteico tetramolecular que incluye al correceptor de los linfocitos T, CXCR4 (Markovic *et al.*, 2004), y no hay información respecto al correceptor de los macrófagos, CCR5.

Por otra parte, se han observado cambios redox en CD4, los cuales pueden ser consecuencia de los intercambios de tioles/disulfuros que ocurren en el complejo CD4-CXCR4-gp120 posterior a la reducción de gp120 por PDI (Barbouche *et al.*, 2003). Se ha indicado que los cambios conformacionales son iniciados de 1 a 4 minutos posterior a la unión del receptor y se completan a los 20 minutos (Jones *et al.*, 1998).

5.4.1.3 Fusión de Membrana mediada por gp41. La unión de gp120 al correceptor dispara cambios conformacionales en gp41 (Maerz *et al.*, 2001; Billington *et al.*, 2007), permitiéndole al péptido de fusión de gp41 insertarse en la membrana de la célula huésped (Fig. 3), mientras que rearreglos posteriores de gp41 y la liberación de gp120, posiblemente asistida por eventos proteolíticos y/o la acción de PDI/tiorredoxina, ponen a las membranas celular y viral en contacto, permitiendo la fusión de membrana y por lo tanto, la internalización del virus (Moore *et al.*, 1990; Ryser and Flückiger, 2005).

5.4.2 Nuevos blancos debido a la participación de PD en la entrada viral

El papel de PDI en la entrada del VIH-1 identifica tres nuevos blancos (Fig. 2) que pueden ser explotados para prevenir la entrada viral, los cuales son procesos esenciales para la infección y difieren de aquellos usados en desarrollo de fármacos anteriores:

5.4.2.1 Actividad enzimática de PDI. El ataque del PDI de superficie de las células blanco por inhibidores impermeables a membrana tiene aspectos terapéuticos

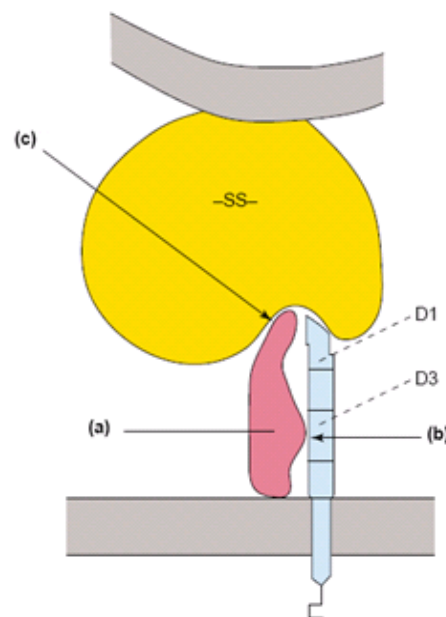


Figura 2. Interacción de PDI con CD4 y gp120. **a)** Actividad enzimática de PDI; **b)** Unión PDI-CD4; **c)** Interacción PDI-gp120. CD4 y PDI alcanzan gp120 en el mismo sitio. Gp120 y PDI se unen a D1 y D3, respectivamente. Modificado de: Ryser and Flückiger, 2005.

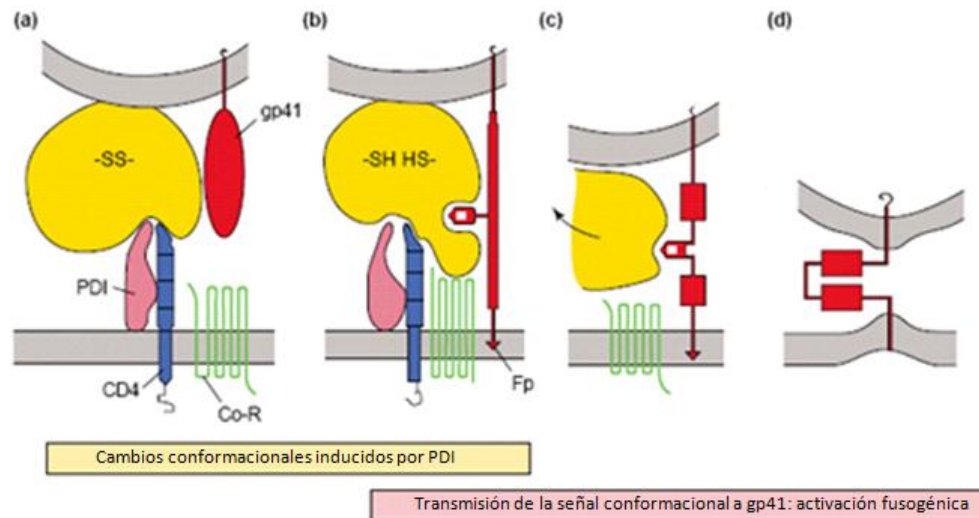


Figura 3. *Modo de acción de PDI en la entrada del VIH-1.* **a)** PDI unido a CD4 hace contacto con gp120 en la región del sitio de unión de CD4-gp120. **b)** Los enlaces disulfuro de gp120 se reducen provocando cambios conformacionales que incrementan la interacción de gp120 con el correceptor (Co-R) y con un pequeño bucle conservado de gp41, lo que a su vez genera cambios conformacionales en gp41 que hacen que el péptido de fusión (Fp) que se inserte en la membrana celular. **c y d)** La distancia en la célula se disminuye y se fusionan las membranas celular y viral. Modificado de: Ryser and Flückiger, 2005.

prometedores, y sólo se encuentra limitado por otras funciones fisiológicas del PDI de superficie (Ryser *et al.*, 1994). Aquellos inhibidores de PDI impermeables a membrana en investigación incluyen bloqueadores de tioles tales, bloqueadores de tioles CXXC adyacentes al sitio activo de PDI (Donoghue *et al.*, 2000; Gallina *et al.*, 2002) y anticuerpos monoclonales anti-PDI (Ryser *et al.*, 1994; Fenouillet *et al.*, 2001; Markovic *et al.*, 2004). No obstante, la inhibición de la actividad del PDI de superficie, no es una opción favorecida debido a que la enzima tiene otras funciones fisiológicas en la superficie celular (Ryser and Flückiger, 2005). Aunque sería interesante aprender si el paso de rearrreglo de PDI en gp120 podría proveer un nuevo blanco terapéutico (Kornbluth, 2004).

5.4.2.2 Interacción PDI-CD4. Este punto es muy prometedor puesto que los dos diferentes sitios de unión de CD4 por gp120 y PDI están lo suficientemente cerca para que las dos proteínas se alcancen mutuamente. La prevención de este contacto tiene el potencial de prevenir la reducción de los enlaces disulfuro de gp120 por PDI y sus consecuencias conformacionales. El bloqueo del sitio de PDI que se une a CD4 también es una posibilidad, puesto que ese dominio es diferente del sitio activo de PDI. Una vez identificado, puede ser bloqueado sin afectar las funciones fisiológicas del PDI de superficie (Ferrari & Söling, 1999).

5.4.2.3 Enlaces disulfuro de gp120 que son sustratos para PDI. Se ha identificado el sitio de gp120 que se une a CD4, el *pocket* Phe 43 (fenilalanina 43 de CD4) (Kwong *et al.*, 1998, 2000; Chen *et al.*, 2005). Al parecer, este *pocket* posee un sitio de unión para los inhibidores de entrada (Madani *et al.*, 2004), lo que abre la posibilidad de que el *pocket* pueda ser el sitio de la interacción de PDI-gp120.

Además, se identificó la misma región de un sitio de unión a BMS 806, un inhibidor de entrada que se une selectivamente a gp120 (Lin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Madani *et al.*, 2004). La presencia de 4 enlaces disulfuro en o cerca de ese sitio sugieren que la unión con BMS 806 puede prevenir que PDI alcance y reduzca los sustratos disulfuro de gp120. Si ese es el caso, BMS 806 antagonizaría PDI al competir por la unión de un sitio localizado en el *pocket* Phe 43, el cual es rico en disulfuros. Esto posicionaría al BMS 806 como el primer inhibidor de entrada que ataca los enlaces disulfuro de gp120 y directamente previene una crítica interacción PDI-gp120 (Reeves *et al.*, 2002; Madani *et al.*, 2004).

5.4.3 Inhibidores de PDI

Se demostró la inhibición de la entrada VIH-1 mediante agentes sulfidrilos impermeables de membrana, que pueden bloquear la función redox de PDI (Ryser *et al.*, 1994), deteniendo la generación de dos tioles libres en gp120. Además, estos antagonistas de PDI inhibieron la transmisión de célula a célula de la infección del VIH (Markovic *et al.*, 2004). Estos agentes son Bacitracina y DTNB (Ryser *et al.*, 1994).

5.4.3.1 Bacitracina. Es un antibiótico cuyo uso clínico mediante administración oral ha tenido un gran impacto debido a su habilidad de erradicar enterococos resistentes a vancomicina del tracto gastrointestinal de pacientes (Chia *et al.*, 1995). Se trata de un antibiótico producido por una mezcla de polipéptidos cíclicos relacionados unos con los otros y producidos por cepas de la variedad Tracy de la bacteria *Bacillus subtilis* aislado en 1945 (Johnson *et al.*, 1945). Su principal mecanismo de acción, se cree que es mediante la inhibición de la síntesis de peptidoglicanos (Storm, 1974). Interfiere con la desfosforilación del C55-fosfato de isoprenil, una molécula que transporta los elementos estructurales del peptidoglicano en la pared celular bacteriana (Stone and Strominger, 1971). Es un inhibidor oxidoreductor de PDI (Mandel *et al.*, 1993), es decir, inhibe tanto las funciones reductivas (Roth, 1981) como las oxidativas (Mizunaga *et al.*, 1990) de PDI, aunque su modo de acción aún no ha sido establecido.

5.4.3.2 DTNB. El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) es un químico usado en para cuantificar la cantidad de grupos tioles (-SH) (Ellman, 1959). El DTNB o reactivo de Ellman, reacciona con el grupo sulfidrilo de la cadena lateral de la cisteína para formar un enlace disulfuro (-SS-) entre la proteína y el residuo, ácido tionitrobenzoico (TNB). Esta modificación generalmente es rápida y selectiva (Tawfik, 2002). Como ya se mencionó, es un bloqueador de sulfidrilos impermeable a membrana, inhibidor de PDI (Gallina *et al.*, 2002). Sin embargo, el modo exacto de la interacción de la unión de DTNB aún está por conocerse.

Debido a que existe mucho que se desconoce sobre el mecanismo de acción de DTNB y Bacitracina, se pretende en este estudio analizar estos compuestos y determinar si además de actuar en PDI celular, también actúan en el virus inhibiendo la infección.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

DTNB y Bacitracina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; los antirretrovirales, Fuzeon (T-20), un IF, Amprenavir, un IP y 118-D-24, un II en investigación (Zhang *et al.*, 2003; Svarovskaia *et al.*, 2004), fueron obtenidos de *AIDS Research and Reference Reagent Program*, División de AIDS, NIAID, NIH y el antirretroviral, UC781, un ITRNN actualmente en investigación (Patton *et al.*, 2007), fue donado amablemente por el Dr. Gadi Borkow. Todos estos compuestos fueron diluidos en medio RPMI 1640.

6.2 Cepas Virales

6.2.1 *VIH-1 IIIB*. Cepa de VIH-1 T-trópica (Popovic *et al.*, 1984a,b; Ratner *et al.*, 1985) obtenida de *AIDS Research and Reference Reagent Program*, División de AIDS, NIAID, NIH. Se cultivó en medio RPMI con suero fetal bovino (10%).

6.2.2 *VIH-1 Ba-L*. Cepa de VIH-1 M-trópica (Gartner *et al.*, 1986; Popovic *et al.*, 1988), obtenida de *AIDS Research and Reference Reagent Program*, División de AIDS, NIAID, NIH. Se propagó en células mononucleares de sangre periférica en medio RPMI.

6.3 Cultivo Celular

6.3.1 *HeLa/CD4-LTR-β-gal*. Es una línea celular modificada de HeLa, la cual proviene de un carcinoma epitelial cervical humano. Expresa el receptor CD4 y además contiene una copia integrada del gen β-galactosidasa que se encuentra bajo el control de un LTR truncado del VIH-1 (Kimpton and Emerman, 1992). Las células HeLa/CD4-LTR-β-gal, o células CD4, se cultivaron en 90% de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma) conteniendo 10% de suero fetal bovino y 4 μL/mL de geneticina.

6.3.2 *HL2/3*. Es una línea celular modificada de HeLa, fue generada por cotransfección de diferentes plásmidos que le confieren a esta línea celular la producción de altos niveles de las proteínas de Gag, Env, Tat, Rev y Nef (Ciminale *et al.*, 1990). Las células HL2/3, o células Env, se cultivaron en 90% de medio DMEM conteniendo 10% de Suero Fetal Bovino (Sigma).

6.4 Ensayos de Citotoxicidad

Las células HeLa/CD4-LTR-β-gal se añadieron en una placa opaca de 96 pozos, 5 x 10⁴ células por pozo, en medio DMEM. Se dejó pasar unas horas (aproximadamente 4 horas) para dejar que las células se pegaran al fondo del pozo en una monocapa. Se les añadió los compuestos DTNB y Bacitracina por separado en medio RMPI 1640, en forma de dilución 1:2 a partir de 60 mM de Bacitracina y 75 mM de DTNB. Las células, junto con los compuestos se dejaron en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂.

Luego, se realizó la determinación de la concentración del compuesto que fuera citotóxica a las células al 50% (Concentración Citotóxica al 50%, CC₅₀). Para esto, se utilizó el kit comercial *CellTiter*^{MR} (Promega), en el que a las células se les añadió un volumen 1:1 del reactivo de este kit, el cual contiene la enzima luciferasa y su sustrato, la luciferina. La reacción de luminiscencia que lleva a cabo esta enzima, además de requerir el sustrato, requiere ATP, por lo que, si los compuestos no tuvieran toxicidad sobre las células, éstas liberarían ATP al medio, y así se produciría la reacción de

luminiscencia. Ésta es cuantificada en un luminómetro de placas (Veritas, Turner BioSystems). Según el protocolo, la lectura puede realizarse 10 minutos posteriores a la adición del reactivo. La luminiscencia detectada es expresada en Unidades Relativas de Luz (URL), las cuales fueron convertidas en porcentaje (una vez que la bioluminiscencia de fondo fue restada de las lecturas). Posteriormente, se procedió a graficar los resultados, para lograr una curva dosis-respuesta, y determinar el CC_{50} , tomando en cuenta controles sin compuesto.

6.5 Ensayos de Inhibición

Las células HeLa/CD4-LTR- β -gal se añadieron en una placa opaca de 96 pozos, 5×10^4 células por pozo, en medio DMEM. Posterior a unas horas de incubación, se les añadió los compuestos DTNB y Bacitracina por separado en medio RMPI 1640, en forma de dilución 1:2 a partir de 25 mM de Bacitracina y 40 mM de DTNB. Enseguida, se añadió a cada pozo VIH-1 IIIB y Ba-L, con una Multiplicidad de Infección de 1, excepto en algunos pozos, para tomarlo como control. Las células, junto con el virus y los compuestos, se dejaron en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Luego, se realizó la determinación de la concentración del compuesto que fuera inhibitoria a las células al 50% (Concentración Inhibitoria al 50%, IC₅₀). Para esto, se utilizó el kit comercial *Beta-glo*^{MR} (Promega), en el que a las células se les añadió un volumen 1:1 del reactivo de este kit, el cual contiene un sustrato de luciferina-galactósido. Este sustrato es usado por la enzima β -galactosidasa que posee la célula, y forma luciferina y galactosa. La luciferina luego es usada en la reacción de la luciferasa para generar luminiscencia. Según el protocolo, la lectura se realizó en 30 minutos. Posterior a la lectura, se graficó y se determinó el IC₅₀.

6.6 Ensayos de Fusión basado en Células Fusogénicas

Las células HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3 por separado se añadieron en una placa opaca de 96 pozos cada una, 5×10^4 células por pozo, en medio DMEM. Posterior a unas horas de incubación, se les añadió por separado, los compuestos DTNB, Bacitracina, y los antirretrovirales siguientes: el IF, Fuzeon (T-20) y el ITRNN, UC781. Todos, en medio RMPI 1640, en forma de dilución 1:2 a partir de 30 mM de Bacitracina, 40 mM de DTNB, 22 μ M de T-20 y 140 nM de UC781, a ambas placas. Se hicieron dos estudios: en el primero, se dejaron en reposo 30 minutos a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂ y enseguida se lavaron las células 3 veces con PBS para eliminar la mayor cantidad de compuestos; y en el segundo estudio, se dejaron 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂ sin lavar. Posterior a esto, sobre la placa que contenía las células HeLa/CD4-LTR- β -gal, se les agregó células HL2/3, 5×10^4 células por pozo, en medio DMEM. Y de igual forma, a la placa con las células HL2/3, se les agregó HeLa/CD4-LTR- β -gal, 5×10^4 células por pozo, en medio DMEM. Para ambas placas, se tomaron en cuenta pozos controles, sin compuesto. Nuevamente, se dejaron en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Luego, se realizó la determinación del IC₅₀ mediante *Beta-glo*^{MR}.

6.7 Ensayo de Actividad Residual

Las células HeLa/CD4-LTR- β -gal se añadieron en una placa opaca de 96 pozos cada una, 5×10^4 células por pozo, en medio DMEM y se dejaron unas horas en

incubación. Por otra parte, se hizo una serie de diluciones 1:2 a partir de 22 mM de DTNB y 12 mM de Bacitracina en medio RPMI. Enseguida, estos compuestos fueron expuestos a IIB y Ba-L con una Multiplicidad de Infección de 1, por 5 minutos. Se tomó en cuenta un control sin compuesto y otro sin virus. Enseguida, se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 1000 rpm, y se procedió a lavar. Esto se repitió tres veces. Posteriormente, las muestras se añadieron a las células HeLa y se dejaron en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Después de eso, se realizó la lectura mediante Beta-glo^{MR}. Se determinó entonces si existía actividad una vez realizado este procedimiento.

6.8 Ensayos por Adición por Tiempos

Las células HeLa/CD4-LTR-β-gal se añadieron en una placa opaca de 96 pozos cada una, 5 x 10⁴ células por pozo, en medio DMEM. Posterior a unas horas de incubación, se añadió a cada pozo VIH-1 IIB con una Multiplicidad de Infección de 1, excepto en algunos pozos, para tomarlo como control. Enseguida, se les añadió por separado, los compuestos DTNB (6 mM) Bacitracina (3.5 mM), T-20 (22 μM), UC781 (70 nM), 118-D-24 (120 μM) y Amprenavir (0.1 mM) en medio RMPI 1640, además de otro control, sin ningún compuesto. Esto se define como el tiempo 0. Enseguida, se añadieron estos tres compuestos por separado cada determinado número de horas, es decir, tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 18, 24, 32 y 48. Después de dejar en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂, se realizó la lectura mediante Beta-glo^{MR}. Se determinó entonces si existía actividad en esos determinados tiempos.

6.9 Ensayos de Protección Celular en Tiempos

Las células HeLa/CD4-LTR-β-gal se añadieron en una placa opaca de 96 pozos cada una, 5 x 10⁴ células por pozo, en medio DMEM. Posterior a unas horas de incubación, se les añadió por separado, los compuestos DTNB (12.6 mM) y Bacitracina (5.3 mM) en medio RMPI 1640, además de otro control, sin ningún compuesto. Se dejó incubando por 30 minutos y enseguida se lavaron las células 3 veces con PBS. Una hora después, se añadió VIH-1 IIB con una Multiplicidad de Infección de 1, excepto en algunos pozos, para tomarlo como otro control. Posteriormente, se añadieron los compuestos a las 3, 6, 10 y 24 horas. Después de dejar en reposo 24 horas a 37° C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂, se realizó la lectura mediante Beta-glo^{MR}. Se determinó entonces si existía actividad realizando estos ensayos.

6.10 Análisis Estadístico

Los resultados se ingresaron en una base de datos, donde fueron analizados por el *Software* estadístico *SigmaPlot for Windows Version 10.0 (2006 Systat Software, Inc)*. Todos los ensayos se repitieron 3 veces en diferentes tiempos. Se tomó en cuenta su desviación estándar al momento de graficar.

7. RESULTADOS

7.1 Citotoxicidad de Bacitracina y DTNB

Primero, se determinó si los compuestos Bacitracina y DTNB son tóxicos en células humanas. Para esto, se realizó un ensayo de citotoxicidad sobre células HeLa/CD4-LTR- β -gal, una línea celular que proviene de un carcinoma epitelial cervical humano. Se determinó la Concentración Citotóxica del compuesto al 50% (CC₅₀), la cual fue 30.37 mM para Bacitracina y 19.77 mM para DTNB (Tabla I).

7.2 Inhibición del VIH-1 por Bacitracina y DTNB

Para poder correlacionar los resultados de citotoxicidad con la potencial actividad inhibitoria de estos compuestos, se determinó la capacidad inhibitoria sobre el VIH-1 de estos dos compuestos, mediante el IC₅₀, es decir, la Concentración Inhibitoria al 50%. Para Bacitracina, fue de 4.99 mM y para DTNB, fue 2.36 mM (Tabla I). A partir de estos resultados, se puede determinar el Índice Terapéutico (IT= CC₅₀/IC₅₀) para ambos compuestos. Entre más arriba de 1 se encuentre este valor, mejor es la acción inhibitoria del compuesto sin llegar a ser tóxica.

Para Bacitracina, su IT= 30.37/4.99, fue de 6.09, lo cual indica que la concentración a la cual ejerce su acción inhibitoria sobre el VIH-1 por mucho sobrepasa la concentración citotóxica. En el caso de DTNB, su IT=19.77/2.36, fue de 8.37, un resultado satisfactorio, un poco mayor que el de Bacitracina.

TABLA I.
Valores de IC₅₀ y CC₅₀ de Bacitracina y DTNB*.

	CC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)		IT (HIV-1 _{IIB} / HIV-1 _{Ba-L})
		HIV-1 _{IIB}	HIV-1 _{Ba-L}	
Bacitracina	30.37	4.99	> 30.37	6.09 / < 1
DTNB	19.77	2.36	6.25	8.37 / 3.16

* CC₅₀, Concentración Citotóxica al 50%; IC₅₀, Concentración Inhibitoria al 50%; IT, Índice Terapéutico.

7.3 Actividad Residual de Bacitracina y DTNB

Para determinar si los compuestos Bacitracina y DTNB tienen efecto inhibitorio sobre el virus en sí, se llevó a cabo un ensayo de actividad residual, donde los compuestos sólo estuvieron en contacto con el virus. Y enseguida, se les expuso a las células, para determinar su efecto.

Cuando estos dos compuestos fueron expuestos a la cepa IIB, los resultados indicaron claramente, una curva dosis respuesta. En el caso de Bacitracina (Fig. 4), el IC₅₀ fue de 1.45 mM, y en el caso de DTNB (Fig. 5), el IC₅₀ fue de 2.66 mM. Al comparar estos datos con los mostrados anteriormente (Tabla I), la diferencia no es mucha entre los IC₅₀, lo que indica que estos dos compuestos pueden inhibir la infección del VIH-1 actuando de igual forma en la célula o en el virus en sí.

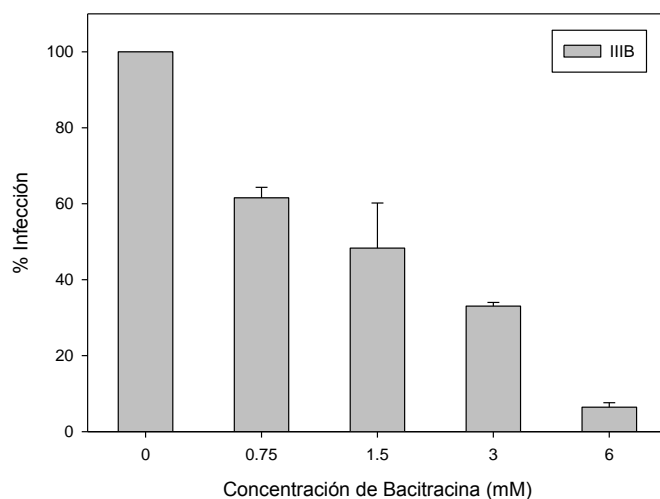


Figura 4. *Actividad Residual de Bacitracina sobre IIB.* Virus IIB fueron expuestos a diluciones seriadas de Bacitracina por 5 minutos, centrifugadas, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{30} fue de 1.45 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

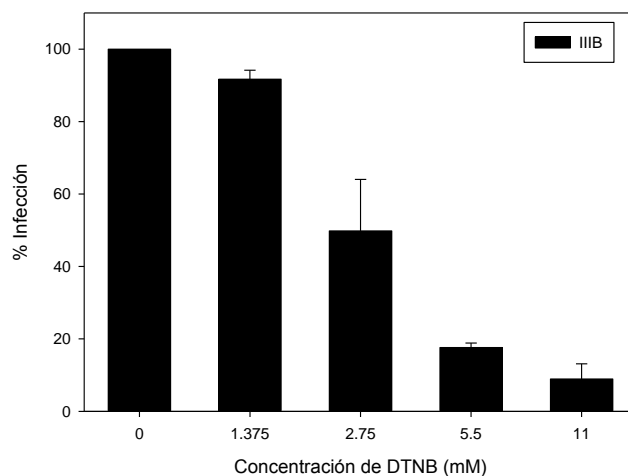


Figura 5. *Actividad Residual de DTNB sobre IIB.* Virus IIB fueron expuestos a diluciones seriadas de DTNB por 5 minutos, centrifugadas, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{30} fue de 2.66 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

7.4 Efecto de Bacitracina y DTNB sobre cepas M-trópicas

Como se muestra en la Tabla I, los efectos inhibitorios de Bacitracina y DTNB se analizaron con una cepa de VIH-1 M-trópica, Ba-L, para determinar si el tropismo viral influye en la actividad inhibitoria de estos compuestos. Tanto para Bacitracina como para DTNB, el IC_{50} no se pudo detectar a una concentración que no fuera tóxica para las células (Tabla I). Comparándolos con los resultados de la cepa IIB, sólo Bacitracina mostró diferencia significativa ($p < 0.05$).

Además, puesto que ya se había confirmado que ambos compuestos poseen efecto inhibitorio sobre el virus IIIB en sí, se procedió a realizar los ensayos de actividad residual sobre Ba-L.

Como se muestra en la Figura 6, Bacitracina tuvo un efecto casi nulo en la inhibición de Ba-L cuando se puso en contacto sólo con el virus. Al comparar estos resultados con los de IIIB, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$). En el caso de DTNB, al exponerse a Ba-L, el IC_{50} no se pudo detectar a una concentración que no fuera tóxica para las células (Fig. 7), y también se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los resultados de las cepas virales.

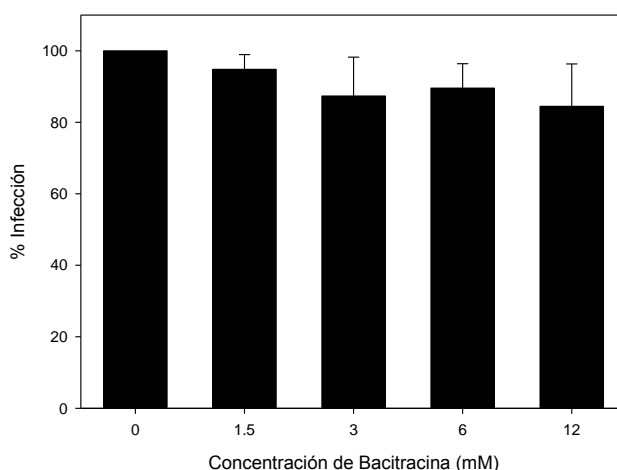


Figura 6. Efecto de Bacitracina sobre Ba-L. Virus Ba-L fueron expuestos a diluciones seriadas de Bacitracina por 5 minutos, centrifugadas, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue mayor de 12 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

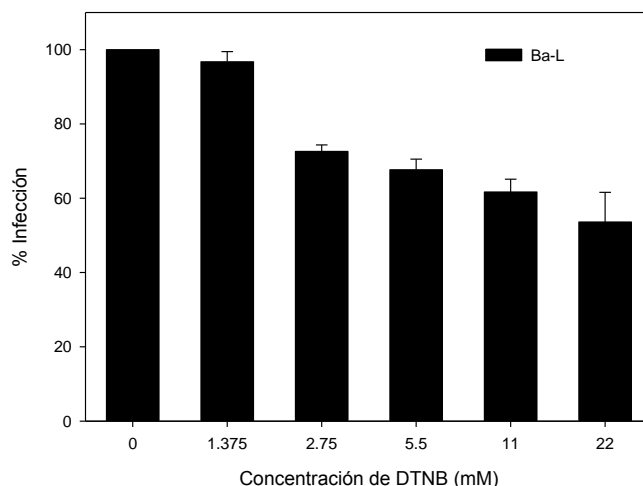


Figura 7. Efecto de DTNB sobre Ba-L. Virus Ba-L fueron expuestos a diluciones seriadas de DTNB por 5 minutos, centrifugadas, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue mayor de 22 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

7.5 Ensayos de fusión basados en células fusogénicas

7.5.1 Efecto inhibitorio sobre las células CD4

Para simular la fusión de las membranas viral y celular que resulta en la infección del VIH-1, se realizó un ensayo basado en células fusogénicas, utilizando las líneas celulares de HeLa/CD4-LTR- β -gal, la cual expresa en la superficie membranal, el receptor del VIH-1, CD4 y correceptores; y la línea celular HL2/3, la cual expresa altos niveles de Gag, Tat, Rev y Nef, y en su superficie expresa Env, es decir, las glicoproteínas gp120 y gp41.

Primero, se determinó si en estas células fusogénicas, se podía inhibir el simulacro de la fusión de estas dos células, mediante Bacitracina y DTNB. Los resultados muestran que tanto Bacitracina (Fig. 8A) como DTNB (Fig. 9A) mostraron una curva dosis-respuesta, y que ambos compuestos pueden actuar inhibiendo en alguna parte del ciclo de la infección del VIH-1. Su IC_{50} fue de 16.65 mM y 30.48 mM, respectivamente. Estos datos fueron comparados con la actividad inhibitoria que presentaron el control positivo T-20, un IF (Fig. 10A) y el control negativo UC781, un ITRNN (Fig. 11A).

Además, se determinó si estos compuestos actuaban solamente en la fase de fusión de la infección del VIH-1. También, por medio de células fusogénicas, se probaron estos mismos compuestos, pero dejándolos actuar sólo 30 minutos sobre las células CD4. Los resultados muestran que tanto Bacitracina (Fig. 8B) como DTNB (Fig. 9B) actuaron en forma de dosis-respuesta, indicando que estos compuestos actúan en la fase de fusión y que ejercen su efecto en la célula CD4. El IC_{50} fue 13.16 mM y 20.20 mM, respectivamente, y no hubo diferencia significativa al comparar estos IC_{50} con los anteriores. Estos resultados se compararon con aquellos que mostraron T-20 (Fig. 10B) y UC781 (Fig. 11B), los cuales resultaron negativos.

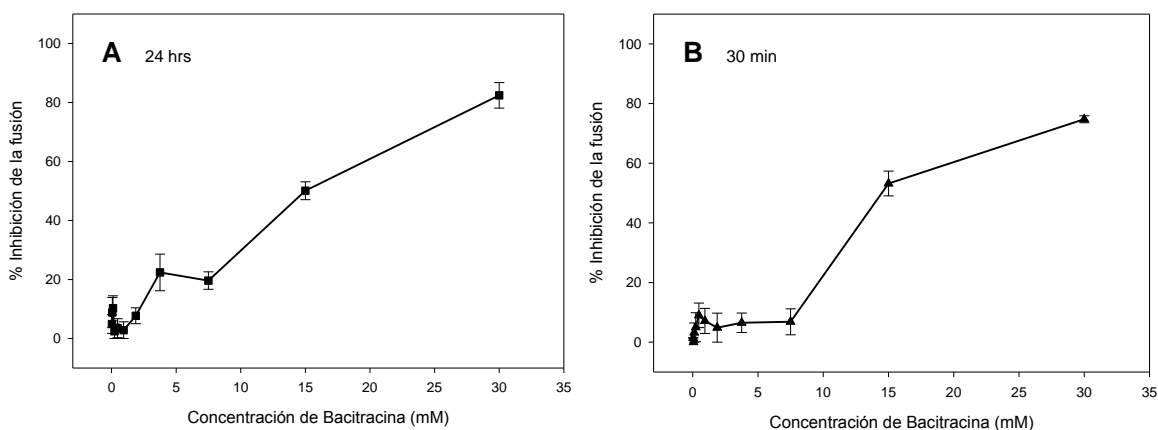


Figura 8. Efecto de Bacitracina sobre células CD4 en la inhibición de la infección. **A)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de Bacitracina por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue de 16.65 mM. **B)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de Bacitracina por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HL2/3 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue de 13.16 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

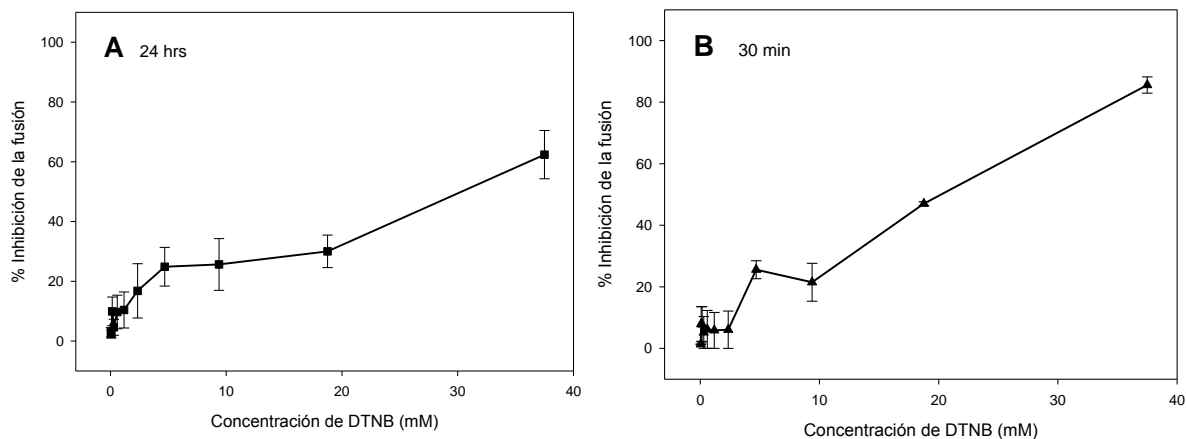


Figura 9. Efecto de DTNB sobre células CD4 en la inhibición de la infección. **A)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de DTNB por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue de 30.48 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado. **B)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de DTNB por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HL2/3 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC_{50} fue de 20.20 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

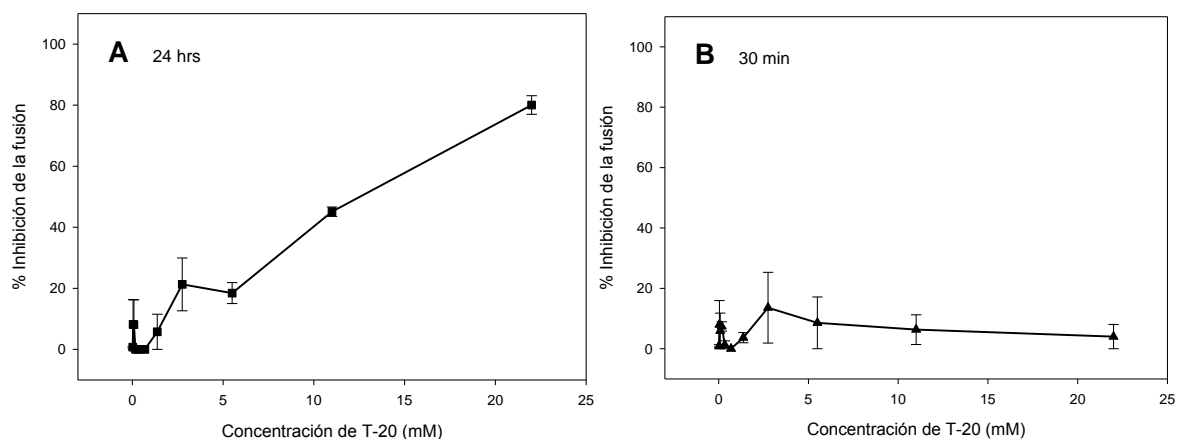


Figura 10. Efecto de T-20 sobre células CD4 en la inhibición de la infección. **A)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de T-20 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control positivo. **B)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de T-20 por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HL2/3 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control negativo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

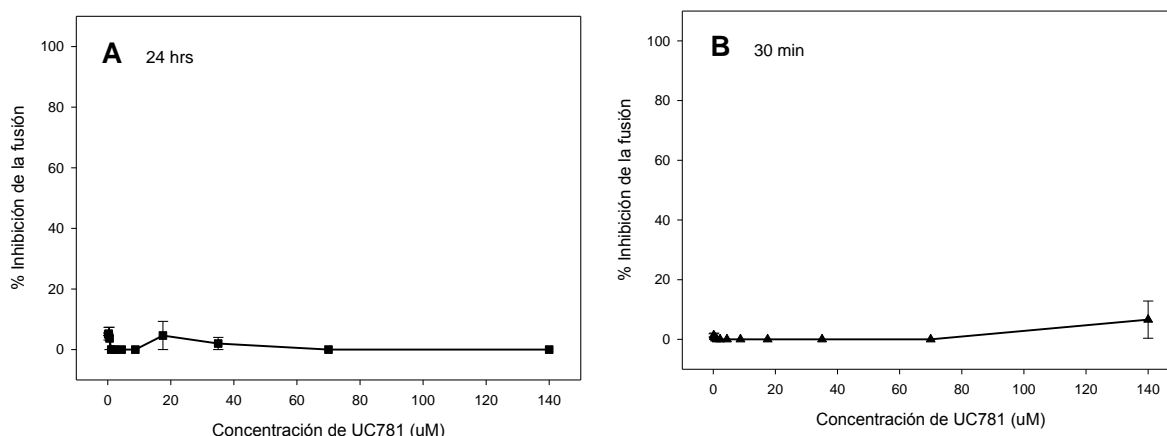


Figura 11. Efecto de UC781 sobre células CD4 en la inhibición de la infección. **A)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de UC781 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control negativo. **B)** Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de UC781 por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HL2/3 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control negativo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

7.5.2 Efecto inhibitorio sobre las células Env

Teniendo los resultados anteriores, en seguida se procedió a corroborar que los compuestos, Bacitracina y DTNB, además de ejercer su efecto inhibitorio en la célula, también tenían efecto en el virus en sí. Se realizaron los ensayos ya mencionados con células fusogénicas, pero ahora, las células que representan al virus, las HL2/3, o células Env fueron expuestas a los compuestos, en vez de las CD4, como ocurrió en el ensayo anterior.

Los resultados muestran que tanto Bacitracina (Fig. 12) como DTNB (Fig. 13), de nuevo, mostraron una curva dosis-respuesta, sin embargo, sus IC_{50} variaron con respecto a los ensayos anteriores. Para Bacitracina, el IC_{50} fue de 23.73 mM (Fig. 12A), un poco más arriba que el 16.65 mM obtenido con las células CD4 (Fig. 8A), aunque no significativamente; y para DTNB, el IC_{50} fue de 9.67 mM (Fig. 13A), significativamente diferente ($p < 0.05$) que el IC_{50} de 30.48 mM obtenido con las células CD4 (Fig. 9A). Estos datos fueron comparados con T-20 (Fig. 14A), como control positivo y UC781 (Fig. 15A), como control negativo.

Enseguida, se determinó si estos compuestos actuaban solamente en la fase de fusión de la infección del VIH-1. También, por medio de células fusogénicas, se probaron estos mismos compuestos, pero dejándolos actuar sólo 30 minutos sobre las células Env. Los resultados muestran que tanto Bacitracina (Fig. 12) como DTNB (Fig. 13) actuaron en forma de dosis-respuesta, indicando que estos compuestos, además de tener efecto sobre las células Env, actúan en la fase de fusión. El IC para Bacitracina fue de 30.0 mM, aunque no alcanzó al 50%, sino hasta el 30% (Fig. 12B), significativamente diferente ($p < 0.05$) del IC_{50} de 13.16 mM en las células CD4 (Fig. 8B). Por otra parte, DTNB resultó en un IC_{50} de 37.49 mM en las células Env (Fig. 13B), sin diferencia significativa del IC_{50} de 20.20 mM de las células CD4 (Fig. 9B). Comparando los ensayos normales y de fusión sobre células Env, no se mostró diferencia significativa

en los IC₅₀ de Bacitracina, pero sí en los de DTNB ($p < 0.05$). Estos resultados se compararon con aquellos que mostraron T-20 (Fig. 14B) como control positivo y UC781 (Fig. 15B) como control negativo.

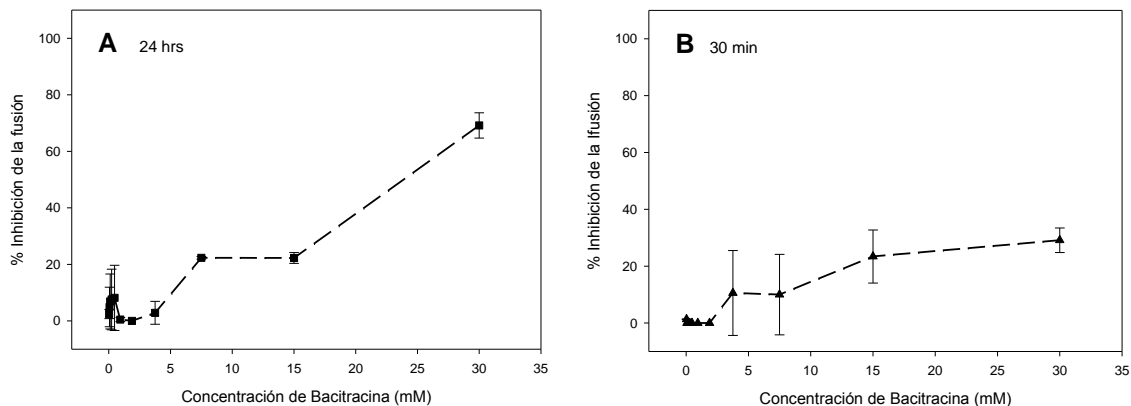


Figura 12. Efecto de Bacitracina sobre células Env en la inhibición de la infección. **A)** Células HL2/3 y HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de Bacitracina por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC₅₀ fue de 23.73 mM. **B)** Células HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de Bacitracina por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC₃₀ fue de 30.0 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

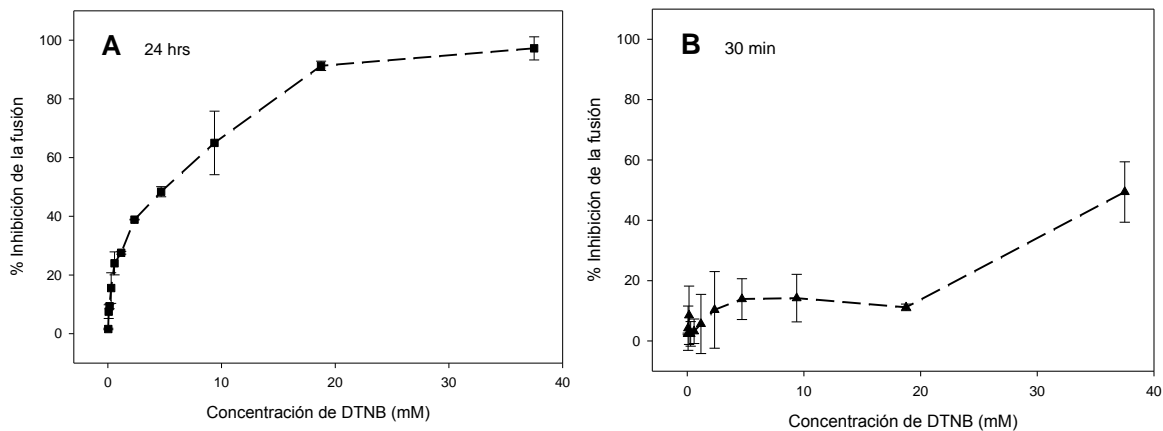


Figura 13. Efecto de DTNB sobre células Env en la inhibición de la infección. **A)** Células HL2/3 y HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de DTNB por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC₅₀ fue de 9.67 mM. **B)** Células HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de DTNB por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. El IC₅₀ fue de 37.49 mM. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

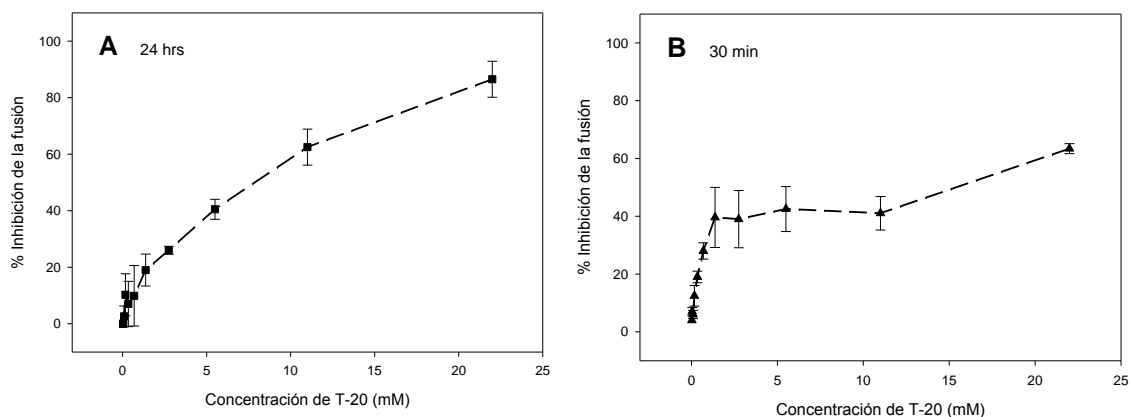


Figura 14. Efecto de T-20 sobre células Env en la inhibición de la infección. **A)** Células HL2/3 y HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de T-20 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control positivo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado. **B)** Células HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de T-20 por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control positivo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

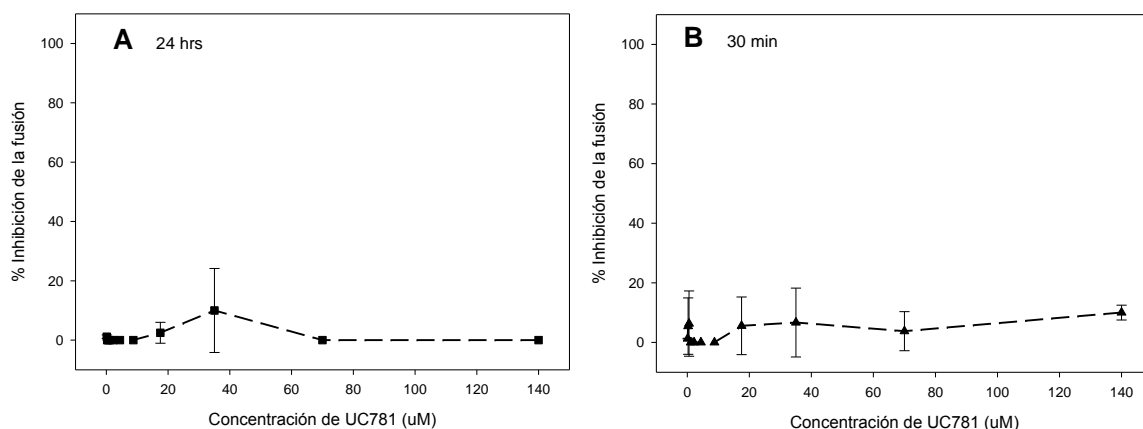


Figura 15. Efecto de UC781 sobre células Env en la inhibición de la infección. **A)** Células HL2/3 y HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a diluciones seriadas de UC781 por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control negativo. **B)** Células HL2/3 fueron expuestas a diluciones seriadas de UC781 por 30 minutos, lavadas, y expuestas a HeLa/CD4-LTR- β -gal por 24 horas y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Este compuesto fue considerado como control negativo. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

7.6 Sitio de Intervención de Bacitracina y DTNB

Para determinar el blanco antiviral de Bacitracina y DTNB, se realizó un ensayo de adición por tiempos usando un ensayo de un solo ciclo de infección. Este ensayo fue usado para delimitar la fase del ciclo viral que es bloqueada por estos dos compuestos.

Como controles, se usaron diferentes antirretrovirales que actúan en diferentes fases del ciclo viral (Fig. 16), y se determinó, mediante la disminución de su efecto inhibitorio, el tiempo de la fase viral en la cual actúan.

La actividad de T-20, inhibidor de fusión, disminuyó después de 2 horas de iniciado el ensayo (Fig. 16A), mientras que UC781, un ITRNN, mantuvo su actividad hasta las 8 horas (Fig. 16B), 118-D-24, un inhibidor de integrasa, a las 18 horas (Fig. 16C) y Amprenavir, un inhibidor de proteasa, hasta las 15-18 horas (Fig. 16D).

En contraste, Bacitracina presentó aún actividad a las 10 horas (Fig. 17), lo que indica, al comparar con la Fig. 16, que Bacitracina posee actividad en el tiempo entre la fase fusión y la fase de la retrotranscripción (Fig. 16B).

Por otra parte, DTNB comenzó a disminuir su actividad a las 15 horas (Fig. 18), indicando que además de inhibidor de fusión, este compuesto actúa en el tiempo entre la fase de fusión y la fase de la integración del genoma (Fig. 16C); pero además también volvió a tener efecto a las 24 horas, lo que podría indicar que pudiera tener efecto en la actividad de la proteasa (Fig. 16D). Es interesante notar que de todas formas, DTNB tuvo efecto en todo el ciclo replicativo del virus (Fig. 18).

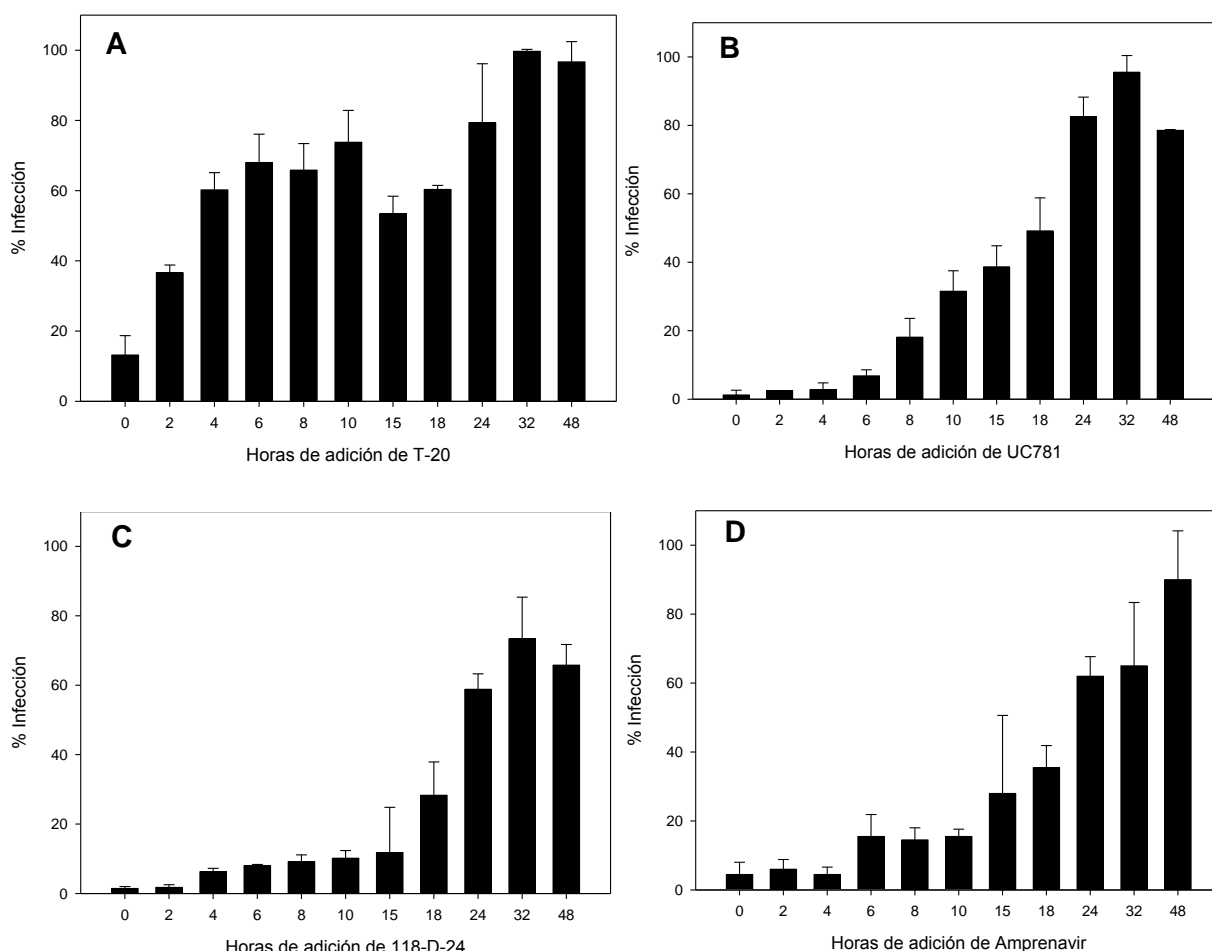


Figura 16. Tiempo de Intervención de Antirretrovirales. Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a IIIB y luego expuestas a diferentes antirretrovirales por tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32 y 48 horas) y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. **A)** IF: T-20. **B)** ITRNN: UC781. **C)** II: 118-D-24. **D)** IP: Amprenavir. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

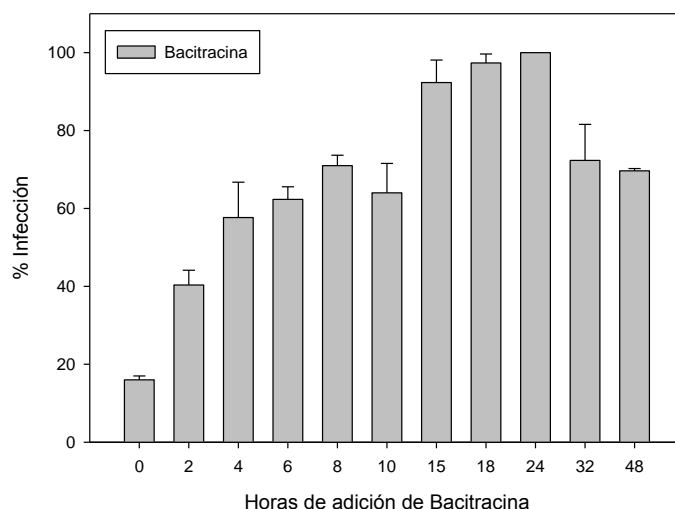


Figura 17. Tiempo de Intervención de Bacitracina. Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a IIIB y luego expuestas a 3.5 mM de Bacitracina por tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32 y 48 horas) y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

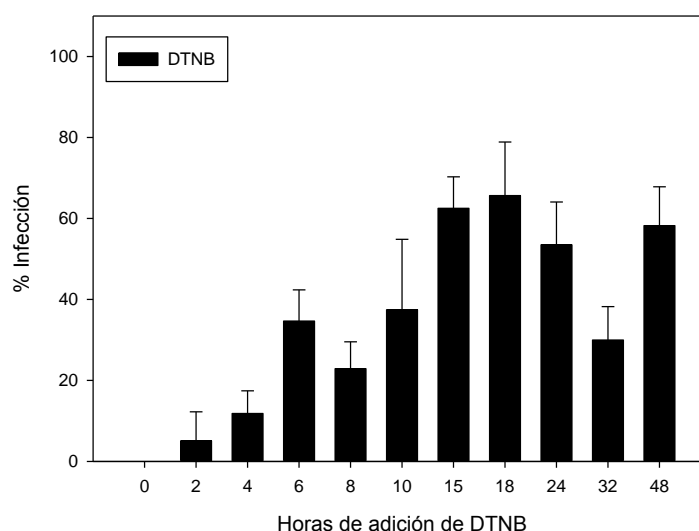


Figura 18. Tiempo de Intervención de DTNB. Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a IIIB y luego expuestas a 6 mM de DTNB por tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32 y 48 horas) y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

7.7 Protección Celular de Bacitracina y DTNB

Como ya se mencionó, Bacitracina y DTNB actúan en la célula CD4 bloqueando PDI, así inhibiendo la infección con VIH-1. Con el fin de determinar por cuánto tiempo dura esta protección de la célula, se realizó en ensayo de protección celular en tiempos. Los resultados muestran que Bacitracina, al parecer, no protege mucho de la infección, puesto que 1 hora después de que se puso la célula en contacto con el compuesto, la infección era en un 70%, porcentaje que gradualmente fue subiendo hasta llegar al 100% de infección a las 48 horas (Fig. 19).

Por otra parte, DTNB mostró resultados muy diferentes. Después de 1 hora, el porcentaje de infección fue prácticamente nulo, y aumentó gradualmente, pero después de 10 horas, este porcentaje no llegó al 50%, lo cual fue sorprendente (Fig. 20). Aún más, a las 48 horas, el porcentaje de infección se mostró por debajo del 100%, indicando, que aunque poco, DTNB aún seguía protegiendo a la célula de la infección a las 48 de entrar en contacto con ella.

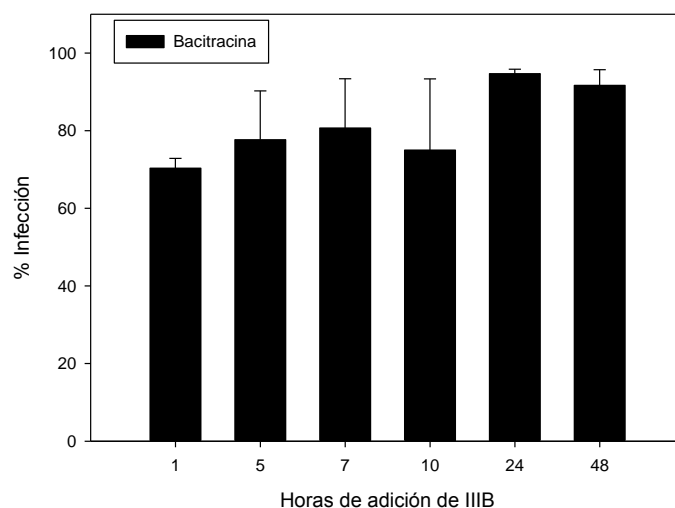


Figura 19. *Protección Celular de Bacitracina.* Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a 5 mM de Bacitracina por 30 minutos, lavadas, y expuestas a IIIB en tiempos (1, 5, 7, 10, 24 y 48 horas) y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

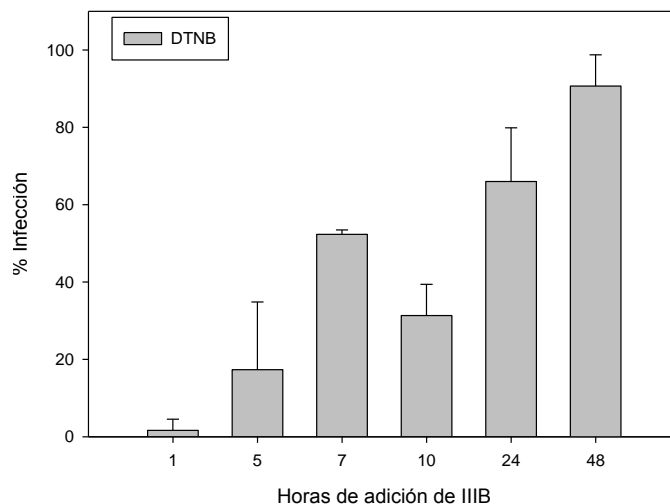


Figura 20. *Protección Celular de DTNB.* Células HeLa/CD4-LTR- β -gal fueron expuestas a 12 mM de DTNB por 30 minutos, lavadas, y expuestas a IIIB en tiempos (1, 5, 7, 10, 24 y 48 horas) y después se realizó la lectura mediante luminiscencia. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados, cada uno por duplicado.

8. DISCUSIÓN

Actualmente, existen 33.2 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el mundo (UNAIDS, 2007). Se considera que el VIH/SIDA es un problema muy grave debido a la persistencia de resistencias asociadas a los fármacos antirretrovirales actualmente usados (Sharma, 2000). La entrada del virus en la célula blanco representa uno de los blancos más atractivos en la búsqueda de nuevos fármacos para tratar la infección de VIH-1. Varios agentes han sido descubiertos por atacar las proteínas reguladoras que son esenciales para la replicación del VIH-1, y se consideran como un prospecto para la prevención del SIDA.

Recientemente, se determinó el papel crítico de la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) en la infección del VIH-1 (Ryser *et al.*, 1994; Fenouillet *et al.*, 2001; Gallina *et al.*, 2002; Barbouche *et al.*, 2003; Markovic *et al.*, 2004). El ataque del PDI de superficie de las células blanco por inhibidores impermeables a membrana tiene aspectos terapéuticos prometedores, sin embargo, se encuentra limitado por otras funciones fisiológicas del PDI de superficie (Ryser *et al.*, 1994). PDI es una proteína celular involucrada en el procesamiento y maduración de las proteínas secretoras en el retículo endoplasmático, en la unión a péptidos, adhesión celular y tal vez, actividades como chaperona (Ferrari & Söling, 1999); la propiedad de PDI de unirse a diferentes péptidos es esencial a su función dentro y fuera de la célula. Por lo tanto, la inhibición de la actividad del PDI de superficie, no es una opción favorecida debido a que la enzima tiene otras funciones fisiológicas en la superficie celular (Gallina *et al.*, 2002; Ryser and Flückiger, 2005), y por ello, los agentes que se conocen como inhibidores de PDI, no es probable que sean de uso terapéutico.

Sin embargo, aún hay mucho por conocer sobre el mecanismo de acción de estos compuestos conocidos como inhibidores de PDI, y por ello se decidió llevar a cabo el presente trabajo, para determinar si existen algunos otros mecanismos que aún no se conozcan, en los cuales estos compuestos actúen y que sean prometedores para su potencial uso como agentes terapéuticos en la infección del VIH-1.

Aunque Bacitracina y DTNB ya habían sido analizados como posibles agentes inhibidores de VIH-1 (Mandel *et al.*, 1993; Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002), en este trabajo se realizaron ensayos de inhibición para corroborar los resultados con aquellos ya publicados. Efectivamente, los resultados publicados, que indican que Bacitracina y DTNB inhiben la infección VIH-1, específicamente la actividad de PDI, a 3 mM (Mandel *et al.*, 1993) y 1 mM (Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002), resultados comparables con los aquí presentados (Tabla I).

Para determinar que un compuesto pueda tener capacidad inhibitoria pero sin ser tóxica, se realizan los ensayos de citotoxicidad (CC_{50}), los cuales son comparados con los ensayos de inhibición (IC_{50}). Si la concentración del compuesto a la cual inhibe no llega a ser tóxica, y aún más, si el IC_{50} está muy por debajo del CC_{50} , este compuesto tiene mayor posibilidad de ser un potencial fármaco antirretroviral. Esta comparación se realiza mediante el Índice Terapéutico ($IT = CC_{50}/IC_{50}$). En los resultados aquí mostrados, se determinó que tanto Bacitracina y DTNB mostraron un IT satisfactorio (Tabla I), y estos resultados no son inesperados, tomando en cuenta que Bacitracina es un antibiótico

de uso común que ha estado en el mercado durante varias décadas contra microorganismos Gram positivos, gonococos y otros (Johnson *et al.*, 1945).

Debido a que en la literatura no se ha reportado nada al respecto, se decidió en este trabajo también analizar el efecto de estos dos compuestos, pero exponiéndolos primordialmente al virus para determinar si Bacitracina y DTNB pueden inhibir la infección actuando en el virus. Esto se realizó mediante ensayos de actividad residual, donde los compuestos sólo estuvieron en contacto con el virus y enseguida, se les expuso a las células, para determinar su efecto (Yang *et al.*, 2005). Sorprendentemente, ambos compuestos mostraron efectos inhibitorios actuando sólo en el virus (Figs. 4 y 5), sugiriendo que Bacitracina y DTNB podrían actuar directamente en la partícula viral, inactivándola. Además, ambos IC₅₀, fueron muy similares a aquellos mostrados en los ensayos de inhibición donde los compuestos se exponen tanto a las células CD4 como al VIH-1 aquí presentados (Tabla I) y en resultados publicados (Mandel *et al.*, 1993; Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002).

Normalmente, en los estudios publicados, los ensayos de inhibición se hicieron en cepas T-trópicas, que se inclinan por el correceptor CCR5 (Mandel *et al.*, 1993; Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002). Por eso, una vez confirmado que ambos compuestos poseen efecto inhibitorio sobre el virus IIIB (una cepa T-trópica) en sí, se determinó su efecto en una cepa de VIH-1 M-trópica (la cual presenta tropismo al correceptor CXCR4), Ba-L, para determinar si el tropismo que presenta el virus influye en la actividad inhibitoria de estos compuestos.

Los valores IC₅₀ de Bacitracina y DTNB requeridos para inhibir la infección de la cepa IIIB fueron significativamente menores que los requeridos para inhibir la infección de la cepa Ba-L (Tabla I; Figs. 4-7), lo que indica que las cepas T-trópicas fueron más fácilmente inhibidas por Bacitracina y DTNB que las cepas M-trópicas. Lo anterior puede sugerir que Bacitracina y DTNB dependen del tropismo viral para inhibir eficientemente la infección del VIH-1 cuando solamente se exponen a la partícula viral. El principal determinante del tropismo en VIH-1 puede ser la causa de la dependencia de estos dos compuestos. La tercera región variable del asa V3 del gp120 del VIH-1 es la principal determinante en cuál correceptor es utilizado (y por lo tanto del tropismo viral) (Hwang *et al.*, 1991), y por lo tanto, podría ser posible que tanto Bacitracina como DTNB pudieran actuar específicamente en este sitio.

Puesto que el modo exacto de la interacción de la unión de Bacitracina y DTNB aún no ha sido establecido, se realizaron ensayos de fusión célula-célula, para profundizar en el entendimiento del efecto que estos compuestos tienen sobre la infección del VIH-1. Estos ensayos, que simulan la fusión de las membranas viral y celular que resulta en la infección del VIH-1 (Yang *et al.*, 2005), se realizaron mediante células fusogénicas, utilizando las líneas celulares de HeLa/CD4-LTR- β -gal y HL2/3, cuya co-cultivación resulta en fusión celular eficiente dentro de 6-12 horas (Ciminale *et al.*, 1990). La proteína Tat de las células HL2/3, que normalmente se encuentra en el VIH-1, es una transactivadora de la transcripción y se une a la región TAR (elementos de respuesta de transactivación) que se encuentra en la región LTR (Berkhout *et al.*, 1990). Las células HeLa/CD4-LTR- β -gal poseen este LTR. Entonces, el Tat se une al

LTR, iniciando así la transcripción de los genes subsecuentes, que en esta línea celular en particular, se trata de la enzima β -galactosidasa.

El efecto de Bacitracina y DTNB fue analizado mediante estos ensayos de fusión célula-célula. Como era de esperarse, tanto Bacitracina (Fig. 8) y DTNB (Fig. 9) mostraron una curva dosis-respuesta respecto a su efecto sobre las células Env, tanto después de 24 horas de reposo (Figs 8A y 9A), como sólo 30 minutos (Figs 8B y 9B), puesto que se sabe que aproximadamente 30 minutos dura el proceso de cambios conformacionales de gp120 posterior a la unión a CD4 (Jones *et al.*, 1998). No se mostró diferencia significativa entre los IC_{50} para los ensayos de 24 horas y 30 minutos, para ambos compuestos. En general, estos resultados concuerdan con aquellos presentados anteriormente donde también se determinó por ensayos de fusión célula-célula, que anticuerpos anti-PDI y dos inhibidores de PDI, alteraron la fusión de membranas mediada por Env en el paso posterior a la unión a CD4 (Fenouillet *et al.*, 2001).

En estos ensayos de fusión célula-célula, T-20 (Inhibidor de Fusión) se usó como control positivo de fusión, por ello, mostró resultados positivos cuando estuvo en contacto directo con las células Env (Figs. 10 y 14), y resultados negativos cuando se puso en contacto directo con las células CD4 en fase de fusión (Fig. 10B). Como control negativo de fusión, se usó UC781 (ITRNN), que mostró resultados negativos en todos los ensayos de fusión célula-célula (Figs. 11 y 15), puesto que las células Env no producen Transcriptasa Reversa viral detectable (Ciminale *et al.*, 1990), y UC781 actúa inhibiendo la actividad de la TR y no actúa en la célula CD4 (Barnard *et al.*, 1997).

Alternativamente, los compuestos fueron expuestos a las células Env. Los resultados mostraron que tanto Bacitracina (Fig. 12A) y DTNB (Fig. 13A) de alguna forma actúan también en las células Env, inhibiendo la fusión con las células CD4. Aún más, en los ensayos exclusivos de fusión, estos dos compuestos mostraron actividad inhibitoria (Figs. 12B y 13B). No obstante, hubo marcadas diferencias en la IC_{50} requerido para cada compuesto. Por ejemplo, para Bacitracina, hubo diferencia significativa del IC_{50} requerido para el ensayo de fusión con las células CD4 (Fig. 8B) con las células Env (la concentración inhibitoria ni siquiera logró un 30% de inhibición) (Fig. 12B). Esto puede sugerir que Bacitracina, aunque también actúa en el virus, actúa mejor en las células CD4 inhibiendo la infección. Además, parece actuar de igual forma en fase de fusión y fases posteriores a la de fusión (puesto que no hubo diferencia significativa en los resultados). Por su parte, DTNB, mostró actividad inhibitoria actuando tanto sobre las células CD4 (Fig. 9A) como las células Env (Fig. 13A), aunque hubo diferencia significativa (IC_{50} menor para las células Env), indicando que al parecer DTNB actúa mejor en la partícula viral. Además, hubo diferencia significativa en los IC_{50} para las células Env en los ensayos de 24 horas con respecto a los de 30 minutos (menor IC_{50} para las 24 h), lo que sugiere que DTNB puede actuar mejor en fases posteriores a la de fusión.

Por lo tanto, se puede concluir que tanto Bacitracina como DTNB (más Bacitracina), al parecer son ligeramente Inhibidores de Fusión, posiblemente, como inhibidores de absorción (interacción de gp120 con CD4), o como inhibidores de fusión virus-célula (interacción de gp120 con el co-receptor) (De Clercq, 1998), sin embargo, DTNB parecen actuar mucho mejor sobre las fases posteriores a fusión.

Las células Env expresan, además de gp120 y gp41 en su envoltura, Gag, Tat, Rev y Nef virales (Ciminale *et al.*, 1990). DTNB interactúa con grupos sulfhidrilo de cisteínas para formar enlaces disulfuro (Ellman, 1959). Leonard *et al.* reportó que gp120 contiene 9 enlaces disulfuro conservados, tres de los cuales están situados cerca del dominio de unión a CD4 (Leonard *et al.*, 1990). El corte de cualquiera de estos enlaces causa cambios conformacionales necesarios para la fusión viral. DTNB podría interactuar con uno (o más) de los tres grupos enlaces disulfuro situados en los dominios de unión a CD4 de gp120, y formar un enlace disulfuro entre DTNB y una cisteína de gp120. Además el enlace disulfuro entre los residuos 296 y 331 forma el asa V3 (Leonard *et al.*, 1990), lo que sugiere que DTNB pudiera actuar en el asa V3 de gp120. Una vez que PDI reduzca los enlaces disulfuro de gp120, DTNB podría formar un enlace disulfuro con una cisteína de gp120, particularmente, dentro del asa V3. Estos resultados confirman los resultados anteriores de tropismo en este estudio que indican que DTNB pudiera actuar sobre el V3 (Tabla I; Figs. 4-7).

Estudios anteriores muestran que Bacitracina no tiene efecto directo en gp120 uniéndose al co-receptor CXCR4, lo que lleva a suponer que Bacitracina pudiera ser un Inhibidor de absorción (Barbouche *et al.*, 2003). Por la forma en que DTNB actuó, es mucho más probable que su mecanismo de acción en el virus, sea en fases posteriores a la de fusión, en específico, sobre Tat, Rev, Nef y/o Gag, aunque no se descarta que Bacitracina actúe en menor grado de esta forma.

La nucleocápside (NCp7), producto de Gag, contiene dos dedos de zinc. DTNB podría formar enlaces cruzados intermoleculares entre los dedos de zinc de moléculas adyacentes, como se ha observado por el compuesto 2,2'-ditiobisbenzamida (DIBA) (Turpin *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 1997; Tummino *et al.*, 1997), y así liberar partículas virales no infecciosas. Por último, Tat es una proteína reguladora de la transcripción de la región promotora LTR y es esencial para la replicación viral (Berkhout *et al.*, 1989, 1990; Rubbert *et al.*, 2006); existen estudios sobre aquellos inhibidores que actúan sobre Tat (Hsu *et al.*, 1991). Contiene una región rica en cisteínas altamente conservada, y mutaciones individuales en 6 de las 7 cisteínas imposibilitan la función de Tat (Ruben *et al.*, 1989; Koken *et al.*, 1994). Las cisteínas funcionan mediante la formación de enlaces disulfuro intramoleculares en moléculas monoméricas de Tat (Koken *et al.*, 1994), y por lo tanto DTNB podría interactuar con estos enlaces disulfuro en Tat. Aunque Bacitracina podría o no actuar de la misma forma que se propone que actúa DTNB, se requieren más estudios para corroborar o descartar esta supuesta interacción de DTNB con gp120, NCp7 y/o Tat.

Para determinar el blanco antiviral de Bacitracina y DTNB, se realizó un ensayo de adición por tiempos usando un ensayo de un solo ciclo de infección. Este ensayo fue usado para delimitar la fase del ciclo viral que es bloqueada por estos dos compuestos (Figs. 16-18). Como controles, se usaron diferentes antirretrovirales con diferentes mecanismos de acción, para así poder determinar en tiempos, el sitio en el cuál actúan.

Los resultados aquí mostrados indican que la fase de fusión se lleva a cabo aproximadamente dentro de 2 horas en el proceso de infección, como lo muestran los resultados de IF T-20 (Fig. 16A), los cuales son similares a aquellos descritos en reportes anteriores por otro inhibidor de fusión (Auwerx *et al.*, 2004). La siguiente fase,

la retrotranscripción del ARN viral en ADN viral, es posible que se lleve a cabo entre las 2 horas y las 8 horas, como lo muestra aquí UC781, un ITRNN (Fig. 16B), cuyos resultados son similares a aquellos presentados en otro trabajo a este ARV (Stevens *et al.*, 2003) y otros ITRAN (Witvrouw *et al.*, 1997, 2000; Hombrouck *et al.*, 2008). El ADN viral luego es transportado al núcleo celular e integrado al genoma celular, y esta fase al parecer se lleva a cabo entre las 8 y 15-18 horas, resultados mostrados por un inhibidor de integrasa en fase investigación, 118-D-24 (Fig. 16C) (Zhang *et al.*, 2003; Svarovskaia *et al.*, 2004). Por último, la fase de maduración, en donde se lleva a cabo el procesamiento de los poliproteínas virales mediante proteólisis, es una fase que según los resultados aquí mostrados por Amprenavir, un IP, se lleva a cabo entre las 18 y 24 horas (Fig. 16D), lo cual corresponde a resultados de otros IP reportados (Witvrouw *et al.*, 2000; Auwerx *et al.*, 2004; Hombrouck *et al.*, 2008).

Comparando estos resultados con los de Bacitracina, que presentó actividad inhibitoria hasta las 10 horas (Fig. 17), se presenta la posibilidad de que este compuesto actúe no solo a nivel de fusión (2 horas), sino que también lo haga en la fase de la retrotranscripción (2-8 horas). Por su parte, DTNB presentó actividad hasta las 15 horas (Fig. 18), indicando que posiblemente, además de actuar en fase de fusión y retrotranscripción, también lo haga en la fase de integración (8-18 horas), y lo que es más, actuó de nuevo en fase de proteasa.

Una vez determinando el modo de acción en el virus de estos dos compuestos, se buscó determinar si estos compuestos tenían algún efecto protector sobre las células CD4, que, aún después de la ausencia de estos compuestos, la infección con el VIH-1 pudiera ser inhibida (Zussman *et al.*, 2003). Los resultados fueron pobres para Bacitracina (Fig. 19), pero para DTNB, a las 10 horas aún había efecto significativo (50% de la inhibición de la infección) por parte de este compuesto (Fig. 20), y muy poco, a las 48 horas. Esto quiere decir que DTNB puede unirse a la célula, muy probablemente a PDI (Ryser *et al.*, 1994; Gallina *et al.*, 2002), y que esta unión es lo suficientemente estrecha como para que su acción perdure 48 horas. Por su parte, al parecer Bacitracina, no tiene esta unión tan estrecha con PDI.

En resumen, a pesar de que los compuestos Bacitracina y DTNB habían sido descartados como agentes terapéuticos en la infección del VIH-1 por ser Inhibidores de PDI, una proteína celular cuyas funciones fisiológicas son muy importantes para la célula (Ferrari & Söling, 1999); en el presente trabajo se determinó que estos compuestos también actúan en el virus en diferentes fases.

De forma ideal, un antirretroviral debe actuar directamente en el virus, preferentemente, en los pasos de replicación previo a la integración de ADN proviral en el genoma celular y ser efectivo a concentraciones no tóxicas (Borkow *et al.*, 1997). Basado en los resultados aquí expuestos y los requerimientos antes mencionados, Bacitracina y DTNB deberían ser estudiados más a fondo para determinar su uso potencial como agentes terapéuticos en la infección de VIH-1, especialmente debido a sus propiedades virucidas. Una mejor comprensión de sus mecanismos de inhibición puede contribuir al desarrollo de nuevos y mejorados agentes antivirales, los cuales pueden ser más eficientes y tener menor citotoxicidad.

9. CONCLUSIONES

Bacitracina y DTNB actúan sobre el VIH-1 impidiendo la infección, y a un IT (a concentraciones no tóxicas) similar al exhibido cuando estos compuestos actuaron sobre PDI celular.

El efecto de Bacitracina y DTNB sobre el virus al inhibir la infección es efectivo en fases de fusión y posteriores a la de fusión (DTNB tuvo mayor efecto inhibitorio que en fases post-fusión).

Bacitracina actúa entre las fases de fusión y retrotranscripción del ciclo viral, y DTNB actúa entre las fases de fusión, integración del genoma viral y actividad de proteasa.

La actividad inhibitoria del VIH-1 de Bacitracina y DTNB es dependiente del tropismo viral, pero lo es en mayor grado para Bacitracina. Ambos compuestos tienen mayor facilidad para inhibir las cepas T-trópicas que las M-trópicas.

Bacitracina no presenta mínima protección celular a la infección con VIH-1 y DTNB presenta alta protección celular que perdura hasta 48 horas.

En conclusión, aunque estos dos agentes por ser inhibidores de PDI habían sido descartados para su uso terapéutico por las importantes funciones fisiológicas de PDI en la célula, en el presente trabajo se determinó que también actúan en el virus, no sólo como Inhibidores de Fusión, sino también como Inhibidores de las fases tardías en la infección.

10. LITERATURA CITADA

- Åsjö B. 2002. Human Immunodeficiency Virus. In: A Practical Guide to Clinical Virology. Haaheim LR, Pattison JR and Whitley RJ. Second edition. John Wiley and Sons Ltd: England. Pp: 213-220.
- Auwerx J, Stevens M, Van Rompay AR, Bird LE, Ren J, De Clercq E, Oberg B, Stammers DK, Karlsson A and Balzarini J. 2004. The phenylmethylthiazolylthiourea NNRTI MSK-076 selects for a resistance mutation in the active site of HIV-2 RT. *J Virol.* 78(14):7427-7437.
- Balzarini J, Brouwer WG, Dao DC, Osika EM and De Clercq E. 1996. Identification of novel thiocarboxanilide derivatives that suppress a variety of drug-resistant mutant HIV-1 strains at a potency similar to that for wild-type virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1454-1466.
- Barbouche R, Miquelis R, Jones IM and Fenouillet E. 2003. Protein disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide-bonds of HIV Env gp120 occurs post CXCR4 binding and is required for fusion. *J. Biol. Chem.* 278: 3131-3136.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. In: HIV Medicine 2006. Hoffmann C, Rockstroh JK and Kamps BS. Flying Publisher: Paris. Pp: 61-86.
- Barnard J, Borkow G and Parniak MA. 1997. The thiocarboxanilide nonnucleoside UC781 is a tight-binding inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem.* 36(25):7786-92.
- Berger EA, Murphy PM and Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB and Jeang KT. 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that Tat requires specific regions of the promoter. *Cell.* 62(4): 757-767.
- Berkhout B, Silverman RH and Jeang KT. 1989. Tat trans-activates the HIV through a nascent RNA target. *Cell.* 59:273-282.
- Billington J, Hickling TP, Munro GH, Halai C, Chung R, Dodson GG and Daniels RS. 2007. Stability of a Receptor-Binding Active HIV-1 Recombinant gp140 Trimer Conferred by Intermonomer Disulfide Bonding of the V3 Loop: Differential Effects of Protein Disulfide Isomerase on CD4 and Coreceptor Binding. *J. Virol.* 81(9): 4604-4614.
- Borkow G, Barnard J, Nguyen TM, Belmonte A, Wainberg MA and Parniak MA. 1997. Chemical Barriers to HIV-1 Infection: Retrovirucidal Activity of UC781, a Thiocarboxanilide Nonnucleoside Inhibitor of HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Virol.* 71(4):3023-3030.
- Bukovsky AA, Dorfman T, Weimann A and Göttinger HG. 1997. Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J. Virol.* 71(2):1013-1018.
- Bulleid NJ. 1993. Protein disulfide-isomerase: role in biosynthesis of secretory proteins. *Adv. Protein Chem.* 44:125-150.

- Campbell SM, Crowe SM, and Mak J. 2001. Lipids rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* 22(3): 217-227.
- Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA. 2009. *Epidemiología del VIH* [Internet]. CENSIDA. Disponible en la red de: <http://www.censida.salud.gob.mx/> [Revisado el 25 de Septiembre del 2009].
- Chan DC and Kim PS. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 93(5): 681-684.
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC and Harrison SC. 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature.* 433: 834-841.
- Chia JK, Nakata MM, Park SS, Lewis RP and McKee B. 1995. Use of bacitracin therapy for infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Infect. Dis.* 21:1520.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 85(7):1135-1148.
- Ciminale V, Felber BK, Campbell M and Pavlakis GN. 1990. A bioassay for HIV-1 based on Env-CD4 interaction. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 6(11):1281-1287.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA and Santos-Ferreira O. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 233(4761):343-346.
- Cochrane AW, Chen CH and Rosen CA. 1990. Specific interaction of the HIV Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1198-1202.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P and Weiss R. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 232(4751): 697.
- Couët J, deBernard S, Loosfelt H, Saunier B, Milgrom E and Misrahi M. 1996. Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry.* 35: 14800-14805.
- Dagleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF and Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 312(5996):763-767.
- De Clercq, E. 1998. Recent developments in the chemotherapy of HIV infections. *Pure & Appl. Chem.* 70(3):567-577.
- DeJong ES, Chang CE, Gilson MK and Marino JP. 2003. Proflavine acts as a Rev inhibitor by targeting the high-affinity Rev binding site of the Rev responsive element of HIV-1. *Biochemistry.* 42(26):8035-8046.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR and Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 381(6584):661-666.
- Donoghue N, Yam PT, Jiang XM and Hogg PJ. 2000. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.* 9: 2436-2445.
- Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA and Rutter WJ. 1985. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature.* 317: 267-270.

- Ellerman DA, Myles DG and Primakoff P. 2006. A Role for Sperm Surface Protein Disulfide Isomerase Activity in Gamete Fusion: Evidence for the Participation of ERp57. *Dev. Cell.* 10(6):831-837.
- Ellgaard L and Ruddock LW. 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO reports* 6(1):28-32.
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Emerman M, Vazeux R and Peden K. 1989. The rev gene product of the HIV virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell.* 57:1155-1165.
- Eron JJ. 2000. HIV-1 protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* 30 Suppl 2:S160-70.
- Fauci AS. 1988. The HIV: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.* 239(4840):617-622.
- Fauci AS, Pantaleon G, Stanley S and Weissman D. 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 124(7): 654-663.
- Feener EP, Shen WC and Ryser HJ. 1990. Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J. Biol. Chem.* 265(31):18780-5.
- Fenouillet E, Barbouche R, Courageot J and Miquelis R. 2001. The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in HIV envelope mediated membrane fusion after CD4 cell binding. *J. Infect. Dis.* 183: 744-752.
- Ferrari DM and Söling HD. 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *J. Biochem.* 339:1-10.
- Freed EO and Martin MA. 2007. Fields Virology. DM Fifth ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. Pp: 1601-1655.
- Freedman RB, Hirst TR and Tuite MF. 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19: 331-336.
- Freedman RB, Klappa P and Ruddock LW. 2002. Catalytic and binding domains in the mechanism and specificity of protein disulphide isomerases: a theme with variations. *EMBO Rep.* 3:136-140.
- Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ. 2002. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* 277: 50579-50588.
- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC and Popovic M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science.* 233:215-219.
- Gilbert HF. 1997. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272: 29399-29402.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA and Saxon A. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. In: Emerging Viruses in Human Populations; Perspectives in Medical Virology. Tabor E. Elsevier Science: USA. Pp: 25-27.
- Guthapfel R, Gueguen P and Quemeneur E. 1996. Reexamination of hormone-binding properties of protein disulfide-isomerase. *Eur J Biochem.* 242(2):315-319.
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science.* 287(5453):607-614.

- Hammes SR, Dixon EP, Malim MH, Cullen BR and Greene WC. 1989. Nef protein of HIV-1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86(23):9549-9553.
- Harris RJ, Chamow SM, Gregory TJ and Spellman MW. 1990. Characterization of a soluble form of human CD4. Peptide analyses confirm the expected amino acid sequence, identify glycosylation sites and demonstrate the presence of three disulfide bonds. *Eur. J. Biochem.* 188(2):291-300.
- Hombrouck A, Van Remoortel B, Michiels M, Noppe W, Christ F, Eneroth A, Sahlberg BL, Benkestock K, Vrang L, Johansson NG, Barreca ML, De Luca L, Ferro S, Chimirri A, Debyser Z and Witvrouw M. 2008. Preclinical evaluation of 1H-benzylindole derivatives as novel HIV integrase strand transfer inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(8):2861-2869.
- Hotchkiss KA, Matthias LJ and Hogg PJ. 1998. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 1388(2):478-488.
- Hsu MC, Schutt AD, Holly M, Slice LW, Sherman MI, Richman DD, Potash MJ and Volsky DJ. 1991. Inhibition of HIV replication in acute and chronic infections in vitro by a Tat antagonist. *Science*. 254(5039):1799-1802.
- Hsu ST and Bonvin AM. 2004. Atomic insight into the CD4 binding induced conformational changes in HIV-1 gp120. *Proteins*. 55:582-593.
- Hu WS and Temin HM. 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*. 250(4985):1227-1233.
- Johnson B, Anker H and Meleney F. 1945. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science*. 102 (2650): 376-377.
- Jones PL, Korte T and Blumenthal R. 1998. Conformational Changes in Cell Surface HIV-1 Envelope Glycoproteins Are Triggered by Cooperation between Cell Surface CD4 and Co-receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 404-409.
- Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM and Saag MS. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* 4(11):1302-1307.
- Kimpton J and Emerman M. 1992. Detection of Replication Competent and Pseudotyped HIV with a Sensitive Cell Line on the Basis of Activation of an Integrated β -Galactosidase Gene. *J Virol.* 66(4):2232-2239.
- König R. 2002. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr. Opin. Immunol.* 14(1):75-83.
- Kornbluth RS. 2004. HIV envelope becomes unhinged by PDI for entry. *Blood*. 103(5): 1567.
- Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, Dayton A, Rosen C, Haseltine W and Sodroski J. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of HIV-1. *Science* 237: 1351–1355.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J and Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393: 648-659.

- Kwong PD, Wyatt R, Majeed S, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J and Hendrickson WA. 2000. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fols. Des.* 8: 1329-1339.
- Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, Trottier B, Walmsley S, Cohen C, Kuritzkes DR, Eron JJ Jr, Chung J, DeMasi R, Donatucci L, Drobnes C, Delehanty J, Salgo M; TORO 1 Study Group. 2003. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med.* 348(22):2175-2185.
- Lawrence DA, Song R and Weber P. 1996. Surface thiols of human lymphocytes and their changes after *in vitro* and *in vivo* activation. *J. Leukocyte Biol.* 60: 611-618.
- Leonard C, Spellman MW, Riddle L, Harris R, Thomas J and Gregory TJ. 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant HIV envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10373-10382.
- Levy JA. 1993. Pathogenesis of HIV Infection. *Microbiological Reviews.* 57(1):183-289.
- Levy J. 2007. HIV and the Pathogenesis of AIDS. Third ed. ASM Press: Washington, DC. Pp: 43-104.
- Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, Gong YF, Wang HG, Rose R, Yamanaka G, Robinson B, Li CB, Fridell R, Deminie C, Demers G, Yang Z, Zadjura L, Meanwell N and Colonno R. 2003. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 11013-11018.
- Lu M, Blackow S and Kim P. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Struct. Biol.* 2: 1075-1082.
- Madani N, Perdigoto AL, Srinivasan K, Cox JM, Chruma JJ, LaLonde J, Head M, Smith AB 3rd and Sodroski JG. 2004. Localized changes in gp120 envelope glycoprotein confer resistance to HIV entry inhibitor BMS-806 and #155. *J. Virol.* 78: 3742-3752.
- Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L and Axel R. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell.* 42(1):93-104.
- Maerz AL, Drummer HE, Wilson KA and Pombourios P. 2001. Functional analysis of the disulfide-bonded loop/chain reversal region of HIV-1 gp41 reveals a critical role in gp120-gp41 association. *J. Virol.* 75: 6635-6644.
- Mandel R, Ryser HJ-P, Ghani F, Wu M and Peak D. 1993. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 4112-4116.
- Markovic I, Stantchev TS, Fields KH, Tiffany LJ, Tomić M, Weiss CD, Broder CC, Strebel K and Clouse KA. 2004. Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood.* 103(5): 1586-1594.
- Matthias LJ and Hogg PJ. 2003. Redox control on the cell surface: implications for HIV-1 entry. *Antioxid. Redox Signal.* 5:133-138.
- Matthias LJ, Yam PT, Jiang XM, Vandegraaff N, Li P, Pombourios P, Donoghue N and Hogg PJ. 2002. Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1. *Nat. Immunol.* 3: 727-732.

- Mizunaga T, Katakura Y, Miura T and Maruyama Y. 1990. Purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase. *J. Biochem.* 108:846-851.
- Moore JP and Doms RW. 2003. The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(19):10598-10602.
- Moore JP, McKeating JA, Weiss RA and Sattentau QJ. 1990. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science.* 250:1139-1142.
- Moore JP, Trkola A and Dragic T. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 551-562.
- Munro S and Pelham HRB. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 48: 899-907.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). 2009. *HIV Replication Cycle* [Internet]. National Institutes of Health. Disponible en el sitio de red: <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/hivReplicationCycle.htm> [Revisado el 25 de Septiembre del 2009].
- Noiva R and Lennarz WJ. 1992. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267:3553-3556.
- Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ and Holmberg SD. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced HIV infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 338(13):853-860.
- Panganiban AT. 1990. Retroviral reverse transcription and DNA integration. In: *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations*. Meager, A. John Wiley & Sons Ltd: England. Pp: 291-318.
- Patton DL, Sweeney YT, Balkus JE, Rohan LC, Moncla BJ, Parniak MA, Hillier SL. 2007. Preclinical safety assessments of UC781 anti-HIV topical microbicide formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(5):1608-1615.
- Pihlajaniemi T, Helaakoski T, Tasanen K, Myllyla R, Huhtala ML, Koivu J and Kivirikko KI. 1987. Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.* 6: 643-649.
- Pomerantz RJ and Horn DL. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* 9(7):867-873.
- Popovic M, Gartner S, Read-Connole E, Beaver B and Reitz M. 1988. Cell tropism and expression of HIV-1 isolates in natural targets. In: *Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases, Colloque Des Cent Gardes*, Girard and Valette (Eds.): Paris, Marnes-La-Coquette. Pp. 21-27.
- Popovic M, Read-Connole E and Gallo RC. 1984b. T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet.* (2):1472-1473.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E and Gallo RC. 1984a. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 224:497-500.
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, Ivanoff L, Petteway SR Jr, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Ghayeb J, Chang NT, Gallo RC and Wong-Staal F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature.* 313:277-284.

- Reeves JD, Gallo SA, Ahmad N, Miamidian JL, Harvey PE, Sharron M, Pohlmann S, Sfakianos JN, Derdeyn CA, Blumenthal R, Hunter E, Doms RW. 2002. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(25):16249-16254.
- Richman DD. 2001. HIV chemotherapy. *Nature*. 410: 995-1001.
- Roth RA. 1981. Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity of glutathione-insulin transhydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 431-438.
- Rubbert A, Behrens G and Ostrowski M. 2006. Pathogenesis of HIV-1 Infection. In: HIV Medicine 2006. Hoffmann C, Rockstroh JK and Kamps BS. Flying Publisher: Paris. Pp: 61-86.
- Ruiz-Argüelles A. 2008. Aspectos Inmunológicos en la infección por VIH/SIDA. En: 25 años de SIDA en México. Logros, Desaciertos y Retos. Instituto Nacional de Salud Pública: México. Pp: 161-180.
- Ryser HJ-P, Mandel R and Ghani F. 1991. Cell surface sulfhydryls are required for the cytotoxicity of diphtheria toxin but not of ricin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 266: 18439-18442.
- Ryser HJ, Levy EM, Mandel R and DiSciullo GJ. 1994. Inhibition of HIV infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:4559-4563.
- Ryser HJ and Flückiger R. 2005. Progress in targeting HIV-1 entry. *DDT*. 10(16): 1085-1094.
- Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai XP, Xuong NH, Axel R, Sweet RW and Hendrickson WA. 1990. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature*. 348: 419-426.
- Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F and Poignard P. 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* 67:7383-7393.
- Schwaller M, Wilkinson B and Gilbert HF. 2003. Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerisation by protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 278:7154-7159.
- Serrao E, Odde S, Ramkumar K and Neamati N. 2009. Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the birth of "me-too" HIV-1 integrase inhibitors. *Retrovirology*. 6:25.
- Sharma R. 2000. Antiretroviral resistance: mechanisms, detection and clinical implications. *J. Pharm. Prac.* 13(6): 442-456.
- Speck RF, Wehrly K, Platt EJ, Atchison RE, Charo IF, Kabat D, Chesebro B and Goldsmith MA. 1997. Selective employment of chemokine receptors as HIV-1 coreceptors determined by individual amino acids in the envelope V3 loop. *J. Virol.* 71: 7136-7139.
- Stevens M, Pannecouque C, De Clercq E and Balzarini J. 2003. Novel human immunodeficiency virus (HIV) inhibitors that have a dual mode of anti-HIV action. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(10):3109-3116.
- Stone KJ and Strominger JL. 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C₅₅-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 68(12):3223-3327.

- Storm DR. 1974. Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235:387-398.
- Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GC, Marchand C, Pommier Y, Burke TR Jr and Pathak VK. 2004. Azido-containing diketo acid derivatives inhibit HIV-1 integrase *in vivo* and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. *J. Virol.* 78:3210-22.
- Täger M, Kröning H, Thiel U and Ansoorge S. 1997. Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp. Hematol.* 25: 601-607.
- Tawfik DS. 2002. Modification of Sulfhydryl Groups with DTNB. In: The Protein Protocols Handbook, Walker JM (eds). 2nd Edition. Humana Press Inc: Totowa, NJ. Pp: 483-484.
- UNAIDS. 2007. *AIDS epidemic update: December 2007* [Internet]. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO). Disponible en el sitio de red: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/default.asp> [Revisado el 25 de Septiembre del 2009].
- Uribe-Zúñiga P. 1999. Aspectos Generales del curso: SIDA. En: Bases Sobre el Conocimiento del VIH/ETS. CONASIDA: México. Pp: 1-33.
- Wang JH, Yan YW, Garrett TP, Liu JH, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz EL and Harrison SC. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature.* 348: 411-418.
- Wang T, Zhang Z, Wallace OB, Deshpande M, Fang H, Yang Z, Zadjura LM, Tweedie DL, Huang S, Zhao F, Ranadive S, Robinson BS, Gong YF, Ricarrdi K, Spicer TP, Deminie C, Rose R, Wang HG, Blair WS, Shi PY, Lin PF, Colonno RJ and Meanwell NA. 2003. Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2- (R)-methylpiperazine (BMS-378806): a novel HIV-1 attachment inhibitor that interferes with CD4-gp120 interactions. *J Med Chem.* 46(20):4236-4239.
- Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN and Joiner BJ. 1990. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J. Biol. Chem.* 265: 9800-9807.
- Witvrouw M, Balzarini J, Pannecouque C, Jhaumeer-Laulloo S, Esté JA, Schols D, Cherepanov P, Schmit JC, Debyser Z, Vandamme AM, Desmyter J, Ramadas SR and De Clercq E. 1997. SRR-SB3, a disulfide-containing macrolide that inhibits a late stage of the replicative cycle HIV. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(2):262-268.
- Witvrouw M, Fikkert V, Pluymers W, Matthews B, Mardel K, Schols D, Raff J, Debyser Z, De Clercq E, Holan G and Pannecouque C. 2000. Polyanionic (i.e., Polysulfonate) Dendrimers Can Inhibit the Replication of HIV by Interfering with Both Virus Adsorption and Later Steps (Reverse Transcriptase/Integrase) in the Virus Replicative Cycle. *Mol. Pharmacol.* 58(5):1100-1108.
- Wyatt R and Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* 280: 1884-1888.
- Yang Q, Stephen AG, Adelsberger JW, Roberts PE, Zhu W, Currens MJ, Feng Y, Crise BJ, Gorelick RJ, Rein AR, Fisher RJ, Shoemaker RH and Sei S. 2005. Discovery

- of Small-Molecule HIV-1 Entry Inhibitors that Target the gp120-Binding Domain of CD4. *J. Virol.* 79(10):6122-6133.
- Yoshimori T, Semba T, Takemoto H, Akagi S, Yamamoto A and Tashiro Y. 1990. Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J. Biol. Chem.* 265: 15984-15990.
- Youree BE and D'Aquila RT. 2002. Antiretroviral Resistance Testing for Clinical Management. *AIDS.* 4:3-12.
- Zai A, Rudd MA, Scribner AW and Loscalzo J. 1999. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest.* 103(3):393-399.
- Zhang X, Pais GC, Svarovskaia ES, Marchand C, Johnson AA, Karki RG, Nicklaus MC, Pathak VK, Pommier Y and Burke TR. 2003. Azido-containing aryl beta-diketo acid HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 13:1215-1219.
- Zussman A, Lara L, Lara H, Bentwich Z and Borkow G. 2003. Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781. *AIDS.* 17(10):1-9.

RESUMEN CURRICULAR

Samantha Maribel Flores Treviño

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología

Tesis: MECANISMOS DE ACCIÓN DE BACITRACINA Y EL ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS-2-NITROBENZOICO EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO I

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacida en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 13 de Abril de 1986, hija de Alfredo Flores Cantú y Ma. Luisa Treviño García.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 2008.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 de la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2007.